

Zyxin und Fyb/SLAP:
Charakterisierung bekannter und neuer Bindungspartner der
EVH1-Domäne der Ena/VASP Proteinfamilie

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Matthias Joseph Krause
aus Göttingen

1. Referent: Prof. J. Wehland

2. Referentin: Prof. B. M. Jockusch

eingereicht am: 1.04.1999

mündliche Prüfung am: 22.06.1999

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. J. Wehland, im folgenden Beitrag vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

M. Krause, K. Rottner, S. Bockholt, M. Reinhard, M. Beckerle and J. Wehland (1998) Detailed analysis of the subcellular localization of human zyxin by immunological and genetic approaches. Poster auf der Jahrestagung der American Society for Cell Biology, 12.-16.12.1998 in San Francisco, CA, USA

1 Inhaltsverzeichnis

1 INHALTSVERZEICHNIS.....	4
2 EINLEITUNG	7
2.1 ORGANISATION UND FUNKTION DES AKTINZYTOSKELETTS	7
2.2 STRUKTUREN, DIE AUS AKTINFILAMENTEN GEFORMT WERDEN:	8
2.3 BEDEUTUNG DER ZELLBEWEGUNG.....	9
2.4 ZELLBEWEGUNG DURCH AKTINPOLYMERISATION.....	9
2.5 REGULATION DER AKTINPOLYMERISATION DURCH AKTIN-BINDENDE PROTEINE	10
2.6 ZELL-ZELL UND ZELL-MATRIX KONTAKTE.....	13
2.7 REGULATION DER ZELLBEWEGUNG DURCH SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE.....	16
2.7.1 Regulation durch Lipid "second messenger".....	16
2.7.2 Regulation durch Ca^{2+}	18
2.7.3 Regulation durch Rho GTPasen	18
2.7.4 Abl und Ena	20
2.7.5 Mena, VASP und Evl.....	20
2.8 LISTERIA MONOCYTOGENES: EIN MODELLSYSTEM DER AKTINPOLYMERISATION	22
2.9 MOLEKULARE ANALYSE DES ACTA PROTEINS	25
2.10 CHARAKTERISIERUNG DER EVH-1 DOMÄNE	26
2.11 WASP, SCAR UND DER ARP2/3 KOMPLEX	27
2.12 T-ZELL AKTIVIERUNG UND REORGANISATION DES AKTINZYTOSKELETTS	29
2.13 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
3 MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1 MATERIALIEN	33
3.2 BAKTERIENKULTUREN	33
3.2.1 Verwendete Lösungen und Puffer:	33
3.2.2 Escherichia coli-Kulturen	34
3.2.3 Kulturbedingungen.....	34
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
3.3.1 Plasmide	35
3.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	35
3.3.3 Phenolisieren von DNA	35
3.3.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase.....	36
3.3.5 Einbau von Restriktionsschnittstellen in PCR-Primer.....	36
3.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	37
3.3.7 RT-PCR.....	38
3.3.8 Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese	39
3.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
3.3.10 Ligation mit T4-DNA-Ligase	41
3.3.11 Transformation in Escherichia coli	41
3.3.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli	42
3.3.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten	43
3.3.14 Screening einer Expressions-Bibliothek.....	46
3.4 PEPTID METHODEN.....	48
3.4.1 Synthese freier Peptide.....	48
3.4.2 Spot-Synthese von immobilisierten Peptiden.....	48
3.5 PROTEIN METHODEN	49
3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
3.5.2 Coomassie-Färbung	51
3.5.3 Silberfärbung	51
3.5.4 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	51
3.5.5 In vitro Transkription und Translation	54
3.5.6 Protein-Bindungsassays	55
3.5.7 Bindungstest an immobilisierten Peptiden (Peptid-Scans).....	55

3.6 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	56
3.6.1 ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay").....	57
3.6.2 Western Blot.....	58
3.6.3 Immunfärbung und Chemolumineszenz.....	59
3.6.4 Immunfluoreszenz.....	61
3.6.5 Immunfluoreszenz von nicht-adhärenenten Zellen.....	62
3.6.6 Immunpräzipitation	63
3.6.7 Herstellung von Hybridomzelllinien zur Produktion monoklonaler Antikörper	64
3.6.8 Reinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein A	67
3.6.9 Herstellung polyklonaler Antikörper	67
3.7 GEWEBEKULTUR.....	68
3.7.1 Verwendete Zelllinien.....	68
3.7.2 Haltung und Passage.....	69
3.7.3 Transfektion von Gewebekulturzellen	70
3.7.4 Mikroinjektion.....	71
4 ERGEBNISSE	73
4.1 HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES ZYXIN.....	73
4.1.1 Bestimmung der Epitope Zyxin-spezifischer monoklonaler Antikörper.....	75
4.1.2 Inhibierung der Antikörperbindung an Zyxin durch lösliche, synthetische Peptide	79
4.2 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON HUMANEM ZYXIN	80
4.3 EGFP-ZYXIN	82
4.3.1 Untersuchung der Expression von EGFP-Zyxin.....	83
4.3.2 EGFP-Zyxin und α -Aktinin kolokalisieren exakt in der gleichen periodischen Anordnung in Stressfasern.....	83
4.4 EGFP-ZYXIN EXPRIMIERENDE STABILE ZELLINIEN	84
4.4.1 Dynamik von EGFP-Zyxin in lebenden Zellen	84
4.5 ZYXIN UND VINCULIN HABEN <i>IN VIVO</i> EINE UNTERSCHIEDLICHE DYNAMIK	85
4.5.1 Zyxin und Vinculin werden zum gleichen Zeitpunkt in fokaler Komplexe eingebaut.....	85
4.5.2 Vinculin und Zyxin haben während Reifung und Bewegung fokaler Kontaktpunkte eine unterschiedliche Dynamik.....	86
4.6 SUCHE NACH NEUEN BINDUNGSPARTNERN DER EVH1 DOMÄNE DER ENA/VASP PROTEINFAMILIE	86
4.7 KLONIERUNG VON FYB/SLAP, EIN POTENTIELLER BINDUNGSPARTNER DER EVH1-DOMÄNE	87
4.8 KLONIERUNG UND EXPRESSION VON GST-FUSIONSPROTEINEN VON FYB/SLAP.....	88
4.9 DOMÄNENSTRUKTUR UND ISOFORMEN VON FYB/SLAP	90
4.10 HERSTELLUNG, AFFINITÄTSREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN FYB/SLAP	92
4.11 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON FYB/SLAP.....	93
4.11.1 Fyb/SLAP ist in Thrombozyten nur in Lamellipodien lokalisiert	93
4.11.2 In Jurkat T-Zellen kolokalisiert Fyb/SLAP mit VASP und F-Aktin	93
4.11.3 Fyb/SLAP kolokalisiert mit F-Aktin, Evl und WASP an der Kontaktstelle zwischen anti-CD3 beschichteten Beads und Jurkat T-Zellen	94
4.12 FYB/SLAP IST EIN NEUER BINDUNGSPARTNER DER EVH1-DOMÄNE.....	95
4.13 VASP IST MIT FYB/SLAP IN HÄMATOPOIETISCHEN ZELLEN <i>IN VIVO</i> ASSOZIIERT	96
4.14 BESTIMMUNG DER VASP- UND MENA-BINDUNGSSTELLE IN FYB/SLAP	96
4.15 DIE SH3-DOMÄNE VON FYB/SLAP BINDET AN DIE C-ABL TYROSINKINASE.....	99
4.16 PROTEINE DER ENA/VASP FAMILIE SIND EIN WICHTIGER FAKTOR FÜR DIE AKTINREORGANISATION IN T-ZELLEN.....	102
4.17 FYB/SLAP BEFINDET SICH IN AKTIVIERENT-T-ZELLEN IN EINEM KOMPLEX MIT WASP.....	104
5 DISKUSSION	106
5.1 DIE ZYXIN-SPEZIFISCHEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPER SIND WICHTIGE WERKZEUGE FÜR DIE CHARAKTERISIERUNG EINER MÖGLICHEN FUNKTION VON ZYXIN IN DER RÄUMLICHEN REORGANISATION DES AKTINZYTOSKELETTS UND DER SIGNALTRANSDUKTION	106
5.2 VERGLEICH DER DYNAMIK VON ZYXIN UND VINCULIN <i>IN VIVO</i>	108
5.3 KLONIERUNG VON FYB/SLAP, EIN WEITERER BINDUNGSPARTNER DER EVH1-DOMÄNE.....	110
5.4 FYB/SLAP HAT EINE BEGRENZTE HOMOLOGIE ZU ACTA	111
5.5 FYB/SLAP WIRD IN ZWEI ISOFORMEN EXPRIMIERT	113

5.6 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION GIBT HINWEISE AUF EINE MÖGLICHE FUNKTION VON PROTEINEN.....	114
5.7 ROLLE VON FYB/SLAP IN DER T-ZELL SIGNALTRANSDUKTION	115
5.8 DIE BINDUNG VON PROTEINEN DER ENA/VASP-FAMILIE AN PROTEINE MIT EVH1-BINDUNGSSTELLEN IST FÜR DIE AKTINREORGANISATION WÄHREND DER T-ZELL AKTIVIERUNG ESSENTIELL	115
5.9 FYB/SLAP KÖNNTE AN DER KONTROLLE DER REORGANISATION DES AKTINZYTOSKELETTS WÄHREND DER T-ZELL AKTIVIERUNG BETEILIGT SEIN.....	116
5.10 EIN KOMPLEX, DER AN DEN T-ZELL REZEPTOR AKTIVIERTER T-ZELLEN REKRUTIERT WIRD, KÖNNTE DIE ACTA ANALOGE FUNKTION HABEN, DIE AKTINNUKLEATION UND -POLYMERISATION ZU INITIIEREN	118
5.11 ROLLE VON FYB/SLAP IN THROMBOZYTEN.....	122
5.12 ANDERE MODELLVORSTELLUNGEN DER REGULATION DER AKTINPOLYMERISATION	124
5.13 ES GIBT HINWEISE AUF ANALOGE AKTINNUKLEATIONS-KOMPLEXE IN NICHT-HÄMATOPOIETISCHEN ZELLEN	125
5.14 AUSBLICK	125
6 ZUSAMMENFASSUNG	127
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	130
8 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	136
9 DANKSAGUNGEN.....	138

2 Einleitung

Eigenständige Lebewesen zeichnen sich durch ihre Abgrenzung zur Außenwelt aus, da auf diese Weise ein eigenes Reservoir an Nährstoffen und Erbinformationen aufrechterhalten werden kann. In allen Lebewesen trennt eine spezialisierte Membran aus Lipiden und Proteinen jeweils hydrophile Innen- und Außenwelt. Doch ab einer gewissen Größe sind Visikel, die von einer Phospholipiddoppelschicht umschlossen werden, instabil. Lebewesen besitzen deshalb auch immer eine strukturegebende Komponente, wie die Zellwand der Prokaryonten und das Zytoskelett der Eukaryonten. Vielzellige Organismen haben zusätzlich noch weitere strukturegebende Systeme wie das Skelett der Vertebraten und die Zellwand der Pflanzenzellen.

Das Zytoskelett der Eukaryonten befindet sich im Gegensatz zur Zellwand der Bakterien innerhalb der Zellmembran und durchspannt das ganze Zytoplasma. Dieser Aufbau ist formstabil und hat den Vorteil, sehr flexibel zu sein: So können tierische Zellen nicht nur schnell ihre Gestalt ändern, sondern sich auch mit Hilfe des Zytoskeletts fortbewegen.

Das Zytoskelett setzt sich aus drei Haupttypen von Proteinfilamenten, den Aktinfilamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten, zusammen. Die Intermediärfilamente verleihen der Zelle Zugfestigkeit und bilden auch Haare und Nägel, die Mikrotubuli sind für die Bewegung von Zellorganellen und den Aufbau der Mitosespindel während der Zellteilung notwendig und definieren die Zellpolarität. Die Aktinfilamente tragen mit dem aktinreichen Cortex direkt unter der Plasmamembran und den in der Zellkultur auftretenden Stressfasern zur Stabilität der Zelle bei. Sie sind aber vor allem auch an der Formveränderung, Phago-/Pinozytose und gerichteten Bewegung von Zellen maßgeblich beteiligt, bis hin zu spezialisierten Vorgängen, wie der Muskelkontraktion.

Da in der hier vorliegenden Arbeit versucht wurde zur Aufklärung von Mechanismen des Aktinzytoskeletts beizutragen, die von grundlegender Bedeutung für die Zellbewegung sind, wird im folgenden ein Überblick über das Aktinfilamentsystem und seine Regulation gegeben.

2.1 Organisation und Funktion des Aktinzytoskeletts

Aktinfilamente bestehen aus polymerisierten, globulären Aktinmonomeren (G-Aktin), die eine Polarität aufweisen, welche durch Bindung von Myosin-Kopffragmenten sichtbar gemacht werden kann. Ein Aktinfilament, das mit Myosin-Kopffragmenten dekoriert ist, sieht aus wie ein Pfeil, dessen Spitze ("pointed end") das Minusende und dessen gefiederter Schaft ("barbed end") das Plusende darstellt (Referenzen siehe Bershadsky and Vasiliev, 1988).

Monomeres G-Aktin hat ein Molekulargewicht von 42 kDa, bindet je ein Nukleotid, ATP oder ADP, ein Ca^{2+} oder Mg^{2+} Ion und hat eine ATPase Aktivität. G-Aktin polymerisiert leicht in Lösungen, die 1 mM Ca^{2+} oder Mg^{2+} enthalten, wobei die Menge an Polymer zuerst sehr langsam und dann weitaus schneller ansteigt, bis sich für die Menge an filamentösem Aktin (F-Aktin) ein Gleichgewicht einstellt. Im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der Nukleationsphase, wird ein Trimer als der kleinste stabile F-Aktin Komplex gebildet. Von dort an verläuft die Polymerisation schneller, wobei die Polymerisation am Plusende mit einer höheren Geschwindigkeit abläuft als am Minusende. Dies bedeutet, daß sich *in vitro* ein Gleichgewichtszustand bildet, bei dem sich Aktinmonomere bevorzugt vom Minusende ablösen und am Plusende anlagern. Diesen Zustand nennt man "Tretmühlenmechanismus" ("Treadmilling"). Durch den Konformationswechsel, den die Aktinmonomere bei der Polymerisation vollziehen, wird bald nach der Anlagerung das gebundene ATP zu ADP hydrolysiert, wodurch die Energie für die Polymerisation bereitgestellt wird. Monomere, die ADP gebundene haben, besitzen im Polymer eine geringere Bindungsaffinität zueinander. Dies erhöht somit die Geschwindigkeit der Depolymerisation vom Minusende im Gleichgewichtszustand.

2.2 Strukturen, die aus Aktinfilamenten geformt werden:

Drei große Gruppen von Aktinfilamentstrukturen können unterschieden werden:

Bündel von parallelen Filamenten mit gleicher Polarität enthalten meist kein Myosin, haben eine hohe Dichte und Ordnung der Filamente und finden sich in spezialisierten Oberflächenausstülpungen, wie z.B. den Mikrovilli des intestinalen Bürstensaumes und in den sogenannten Stereocilien der Haarzellen des Innenohrs höherer Vertebraten. Die Plusenden ("barbed ends") dieser Filamente sind zur Zellmembran hin ausgerichtet (siehe Übersichtsarbeit: Bretscher, 1991).

Bündel von Aktinfilamenten mit entgegengesetzter Polarität enthalten Myosin, wie die Myofibrillen des gestreiften Muskels und die sogenannten Stressfasern, die in Fibroblasten, aber auch in vielen anderen Zellen in Zellkultur gefunden werden. Stressfasern beginnen und enden an den fokalen Kontaktpunkten, mit denen sich die Zelle an der extrazellulären Matrix anheftet. In den Stressfasern sind bestimmte Aktin-bindende Proteine periodisch verteilt. So wechseln sich Gebiete mit α -Aktinin und Myosin ab. Myosin enthaltende Aktinfilamentbündel finden sich auch im kontraktilen Ring, der sich während der Zellteilung formt und verantwortlich für die Zytokinese ist. Die Aktinfilamente, die das Zytoplasma von glatten Muskelzellen ausfüllen,

können als weitere Variante von Aktinfilamenten mit gegensätzlicher Polarität angesehen werden.

Dreidimensionale Netzwerke von langen Aktinfilamenten kommen im submembranösen Cortex vieler Nichtmuskel-Zellen vor, geben den Zellen Stabilität und bilden die Grundlage für die Lamellipodien und Membran-ruffles. Ein Lamellipodium ist ein breiter Ausläufer der Zellmembran, in dessen Richtung sich die Zelle fortbewegen will. Wenn dieser Ausläufer der Zellmembran sich nach oben richtet und ähnlich einer Welle rückwärts über die Zelle läuft, wird er als Membran-ruffle bezeichnet. Lamellipodien enthalten zusätzlich noch F-Aktinbündel, die durch Koaleszenz von Aktinfilamenten aus dem Netzwerk zu entstehen scheinen und, wenn sie über den Zellrand hinausragen, als Mikrospiques oder Filopodien bezeichnet werden (siehe Übersichtsartikel: Welch et al., 1997).

2.3 Bedeutung der Zellbewegung

Die Zellbewegung spielt eine wichtige Rolle bei komplexen zellulären Prozessen wie Embryonalentwicklung, Entzündung und der Wundheilung und muß deshalb durch Signale von außerhalb der Zelle kontrolliert werden. Störungen dieser Signaltransduktionswege spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und im Verlauf vieler Krankheiten. Veränderungen in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen und eine verstärkte Zellbewegung sind Kennzeichen von maligner Entartung. Es gibt zahlreiche Hinweise, daß Störungen in den Signalkaskaden, die die Zellbewegung kontrollieren von fundamentaler Bedeutung für die Tumordinvasion und die Metastasierung sind (Ben-Zeév, 1997). Bei Entzündungsprozessen und der Wundheilung sind starke Veränderungen in der Zellbewegung entscheidend für eine physiologische Reaktion des Organismus auf Krankheiten und Verletzungen.

2.4 Zellbewegung durch Aktinpolymerisation

Die Bewegung von Zellen über ein Substrat ist ein komplexer Vorgang, der wie folgt abläuft: Das Aktin-Zytoskelett schiebt an einer Seite der Zelle aktiv die Zellmembran nach vorne (Lamellipodien und Filopodien), heftet dort über Transmembranproteine (z.B. Integrine) das Zytoskelett neu am Substrat an und zieht dann den hinteren Teil der Zelle aktiv nach, wobei die alte Verbindung zum Substrat gelöst werden muß.

Die Polymerisation von Aktinfilamenten, die mit ihren schnellwachsenden Enden zur Zellmembran hin ausgerichtet sind, ist die treibende Kraft für die Zellbewegung (siehe Übersichtsartikel: Mitchison and Cramer, 1996). Erste Hinweise dafür waren die Versuche von

Wang (1985), der den Einbau von fluoreszenzmarkiertem G-Aktin in ein durch einen Laserstrahl ausgebleichenes Lamellipodium in lebenden Fibroblasten untersuchte und damit einen Aktinfluß von der Front des Lamellipodiums in die Zelle zeigen konnte. Elektronenmikroskopische Studien zeigten dann, daß die Aktinfilamente mit ihren schnell wachsenden Plusenden in Fibroblasten und Fischkeratozyten zur Zellmembran hin ausgerichtet sind (Small et al., 1978; 1995). Die Polymerisation dieser Aktinfilamente bewirkt eine vorwärtsgerichtete Kraft, die das Lamellipodium und die Filopodien vorantreibt.

Ein entscheidendes Experiment wurde von Theriot und Mitchison (1991) durchgeführt. Sie führten durch Mikroinjektion photoaktivierbares G-Aktin in lebende Zellen ein und aktivierten die Fluoreszenz in einem Frontsegment des Lamellipodiums. Sie beobachteten, daß das fluoreszenzmarkierte Aktinsegment relativ zum Substrat stationär blieb, während der Keratozyt sich fortbewegte. Diese Daten können durch zwei Modelle erklärt werden: der "nucleation release" und der "treadmilling" Hypothese. Die "nucleation release" Hypothese geht davon aus, daß kurze Filamente (weniger als 0,5 µm lang) neu an der Front des Lamellipodiums gebildet und dann in das Zytoplasma freigesetzt werden, während die "treadmilling" Hypothese eine Polymerisation an der Front und eine Depolymerisation am hinteren, dem Zytoplasma zugewandten Ende des Lamellipodiums der sich über die ganze Tiefe des Lamellipodiums erstreckenden Aktinfilamenten vorschlägt. Von diesen beiden Modellen ist nur die "treadmilling" Hypothese mit den elektronenmikroskopischen Daten in Einklang zu bringen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Lamellipodien von Keratozyten zeigten, daß die Aktinfilamente, die mit ihrem Plusende zur Plasmamembran ausgerichtet sind, sehr lang sind. Ihre Länge kann mehrere µm betragen. Es sind jedoch nicht alle Filamente gleich lang, so daß ein Gradient in der Filamentdichte über die Tiefe des Lamellipodiums beobachtet wurde. Die Filamente bilden ein diagonales Netzwerk, in einen Winkel von ungefähr 45° zur Plasmamembran (siehe Übersichtsartikel: Small et al., 1996).

2.5 Regulation der Aktinpolymerisation durch Aktin-bindende Proteine

Wie unter 2.1 ausgeführt, wächst ein Aktinfilament im Gleichgewichtszustand *in vitro* am Plusende, während es gleichzeitig am Minusende depolymerisiert ("Treadmilling"). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Depolymerisation vom Minusende, was zu einer geringen Wachstumsrate am Plusende führt, da im Gleichgewichtszustand die Wachstumsrate am Plusende von der Konzentration an freiem G-Aktin abhängig ist.. Dies würde nur für eine Geschwindigkeit der Fortbewegung des Lamellipodiums von ungefähr 0,05 µm/min reichen (Carlier, 1998), *in vivo* werden aber Geschwindigkeiten von 1 µm/min bei Fibroblasten und bis zu 25 µm/min bei Fischkeratozyten gemessen (Referenzen in Small et al.,

1996). *In vivo* könnte die Geschwindigkeit des "Treadmilling" aber durch drei Arten von Aktin-bindenden Proteinen reguliert werden: Dies sind die "Capping" Proteine, die Aktin-Depolymerisations-Faktoren (ADF/Cofilin) und die Aktinmonomer-bindenden Proteine (Thymosin- β 4 und Profilin) (siehe Übersichtsartikel: Carlier, 1998; Sun et al., 1995).

"Capping"-Proteine

Die "Capping"-Proteine binden an die Plusenden der Aktinfilamente und blockieren die Polymerisation weiterer Aktinmonomere (siehe Übersichtsartikel: Schafer and Cooper, 1995).

Zu den "Capping" Proteinen gehören Gelsolin, seine ihm verwandten Proteine, Severin, Adseverin/Scinderin, Villin, Fragmin und das Capping Protein (CP), welches das Homolog des in Muskelzellen vorkommenden CapZ Proteins in Nicht-Muskelzellen ist.

Gelsolin und seine ihm verwandten Proteine binden sehr stark an die Plusenden der Aktinfilamente und können diese auch durchtrennen ("Severing"-Aktivität). Diese "Severing"-Aktivität fehlt dem Capping Protein (CP) und seinem Homologen CapZ.

Die "Capping"-Proteine könnten die auf dem Aktinzytoskelett basierende Zellbewegung verstärken. Sie könnten für eine höhere Konzentration von ATP-G-Aktin im Zytoplasma sorgen, indem sie einen großen Anteil der Plusenden blockieren, an die dadurch kein G-Aktin mehr polymerisiert werden kann. An der Plasmamembran könnten selektiv "Capping"-Proteine von wenigen Plusenden entfernt werden, die dann frei vorliegen und sehr schnell wachsen könnten. Die Freisetzung von Untereinheiten von den Minusenden vieler durch "Capping"-Proteine blockierter Aktinfilamente könnte einen Tretmühlenmechanismus zu einer geringen Zahl nicht blockierter Plusenden unterhalten (Carlier, 1998).

Die ADF/Cofilin Proteinfamilie

Die Mitglieder der ADF/Cofilin Proteinfamilie sind ubiquitär vorkommende, konservierte Aktin-bindende Proteine. Es gibt viele Hinweise, daß es ihre biologische Funktion ist, das "Treadmilling" zu verstärken. Dieser Effekt könnte vor allem durch die Fähigkeit von ADF bewirkt werden, bevorzugt an die Form von G- und F-Aktin zu binden, die ADP gebunden hat. Dies hat zur Folge, daß die Rate der Depolymerisation von ADP-F-Aktin vom Minusende der Aktinfilamente *in vitro* um das fünfundzwanzigfache gesteigert wird. Dadurch wird die Gleichgewichtskonzentration von ATP-G-Aktin vergrößert und damit auch die Polymerisationsrate an freien Plusenden erhöht. Dies sollte zu einer Verstärkung der auf dem Aktinzytoskelett basierenden Zellbewegung führen (Carlier et al., 1997).

Eine in früheren Arbeiten gefundene F-Aktin durchtrennende ("severing") Aktivität von ADF wurde von Carlier et al. (1997) in ihren *in vitro* Versuchen zwar nicht gefunden, es ist aber

auch weiterhin nicht auszuschließen, daß diese Aktivität *in vivo* relevant ist (siehe Übersichtsartikel: Theriot, 1997).

Aktinmonomer bindende Proteine

Profilin (Referenzen siehe Übersichtsarbeit: Schlüter et al., 1997)

Profilin ist ein, ubiquitär vorkommendes, G-Aktin bindendes Protein. Weiterhin bindet es an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂), das um die G-Aktin Bindungsstelle am Profilin konkurriert, an den Arp2/3 Komplex aus *Acanthamoeba* ("Actin related protein 2/3 complex", ein Komplex von sieben Proteinen, von denen zwei mit Aktin verwandt sind; siehe auch 2.11) und Poly-L-Prolin oder Proteine die prolinreiche Motive tragen, wie VASP (für Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein) und Mena (mammalian Enabled) (siehe 2.7.5), die Hefepoteine Bni1p, Bnr1p, das *Drosophila* Cappuchino und p140mDia, das Säugerhomolog des *Drosophila* Proteins Diaphanous.

Profilin existiert in zwei Isoformen, die in ihrer Aminosäuresequenz nur zu circa 65 % identisch sind (Honoré et al., 1993). Ihre Bindungsaffinitäten an Aktin sind ähnlich, jedoch hat Profilin I eine größere Affinität zu Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) und Profilin II eine größere Affinität zu Poly-L-Prolin und VASP (Lambrechts et al., 1997).

In vitro bildet Profilin mit ATP-G-Aktin einen Komplex, der sich an das Plusende von Aktinfilamenten anlagern kann und dadurch die Polymerisation verstärkt, indem es die kritische Gleichgewichtskonzentration verringert (Tilney et al., 1983; Pantaloni and Carlier, 1993).

Weiterhin fungiert Profilin als Nukleotid-Austauschfaktor, der die Rate des Adenin-Nukleotid Austausches am G-Aktin von ADP zu ATP verstärkt. Da ADP-G-Aktin langsamer polymerisiert als ATP-G-Aktin würde unter Bedingungen, in denen ADP-Aktin dominiert, Profilin die Aktinpolymerisation verstärken. Ob dieser Effekt *in vivo* relevant ist, ist umstritten (siehe Übersichtsartikel: Sun et al., 1995).

Profilin ist in der Zelle besonders in den Regionen konzentriert, die eine erhöhte Dynamik der Aktinfilamente aufweisen, wie zum Beispiel Lamellipodien (Buss et al., 1992). Es findet sich auch an einem Pol an der Oberfläche des fakultativ intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes*, wo Aktinpolymerisation induziert wird und das sich dadurch mit Hilfe des Aktinzytoskeletts in der Wirtszelle fortbewegt (Theriot et al., 1994).

Thymosin-β4

Thymosin-β4 ist ausschließlich ein Aktinmonomer-bindendes Protein und hat die idealen Voraussetzungen, als ATP-G-Aktin Speicher zu dienen, der die freie G-Aktin Konzentration im Zytoplasma gering hält, da ATP-G-Aktin ab einer bestimmten Konzentration von selbst im Zytoplasma polymerisieren würde (siehe Übersichtsartikel: Sun et al., 1995). Thymosin-β4 ist aber auch in der Lage polymerisationskompetentes G-Aktin freizusetzen. *In vitro* wird der Effekt einer geringen Menge Profilin, die Aktinpolymerisation am Plusende zu verstärken, durch die Anwesenheit eines großen G-Aktin-Thymosin-β4 Pools erhöht (Pantaloni and Carlier, 1993).

2.6 Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte

Für das Entstehen von multizellulären Organismen ist die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten und Kontakten zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix von entscheidender Bedeutung. Diese Kontakte bilden nicht nur einen strukturellen Halt für die Zellverbände, sondern sind auch Orte der Zell-Zell Kommunikation, welche auf die Zellform, Zellbewegung, Genexpression und Wachstum Einfluß nimmt und deshalb streng reguliert sein muß. Die Regulation der Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte ist eng verknüpft mit der Regulation der Zellbewegung und beide spielen unter anderem in so grundlegenden Prozessen wie der Embryonalentwicklung, in der Wundheilung, aber auch in pathologischen Prozessen wie der Metastasierung eine entscheidende Rolle (siehe **2.3 Bedeutung der Zellbewegung**).

Zell-Matrix Kontakte sind heterogen, wobei die in der Zellkultur von Fibroblasten, epithelialen und endothelialen Zellen auftretenden fokalen Kontaktpunkte am intensivsten untersucht wurden und als Modellsystem für in Organismen vorkommenden Zell-Matrix Kontakte, wie den "dense plaques" der glatten Muskelzellen und den Aktin-assoziierten Kontaktstellen zwischen Epithelien und der Basal-Lamina dienen (siehe Übersichtsartikel: Jockusch et al., 1995).

Die transmembranöse Verbindung zwischen Mikrofilamenten und extrazellulärer Matrix wird durch die heterodimeren Integrine hergestellt, die als Rezeptoren für unterschiedliche Matrixproteine, wie Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Laminin und Collagen fungieren (siehe Übersichtsartikel: Hynes, 1992).

In Zell-Zell Kontakten, wie z.B. den "zonula adhaerens" in Epithelien, bilden die Cadherine die transmembranöse Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und Nachbarzellen, indem sie Ca^{2+} -abhängige homophile Interaktionen zwischen entsprechenden Cadherinmolekülen benachbarter Zellen bilden (siehe Übersichtsartikel: Gumbiner, 1996). Auf der zytosolischen Seite ist das

Vorkommen von α -Catenin, β -Catenin und Plakoglobin spezifisch für die Zell-Zell Verbindung (siehe Übersichtsartikel: Yamada and Geiger, 1997).

Intrazellulär finden sich sowohl an Zell-Zell-, als auch an Zell-Matrix-Kontakten große Proteinkomplexe mit einer Vielzahl von Proteinen, die sowohl an der Signaltransduktion, als auch am Aufbau der Kontakte beteiligt sind (siehe Übersichtsartikel: Jockusch et al., 1995; Yamada and Geiger, 1997): Es finden sich Tensin, Vinculin, α -Aktinin, Radixin, Aktin, Zyxin, CRP (Cystein rich Protein), VASP (Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein), Profilin und nur in den fokalen Kontaktpunkten Talin, Paxillin und FAK (Focal adhesion kinase). Zusätzlich findet man noch folgende Kinasen und Adaptermoleküle: Kinasen der Src Familie, Protein Kinase C, Phospholipase C, PI(3)-Kinase, CSK, Grb2, Sos, SHC, p130^{CAS} und Crk.

Obwohl sehr viele Protein-Protein Interaktionen zwischen ihren Bestandteilen bekannt sind, ist die Regulation und Dynamik der Zell-Zell und Zell-Matrix Kontaktstellen kaum verstanden.

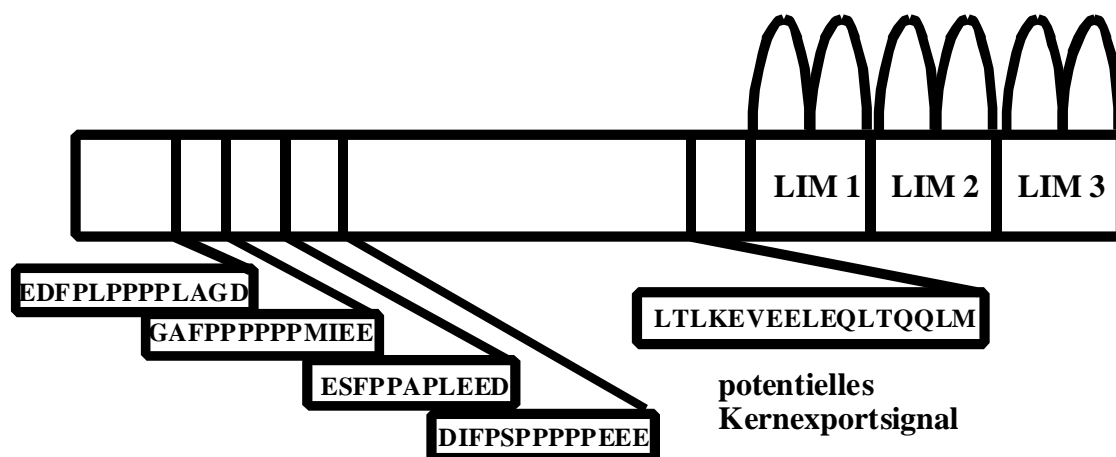
Zyxin

Zyxin wurde bei der Routineuntersuchung des Serums eines nicht immunisierten Kaninchens in der Immunfluoreszenzmikroskopie als Bestandteil von fokalen Kontaktpunkten und an den Enden der Stressfasern in Hühnerembryo-Fibroblasten entdeckt (Beckerle, 1986). Aus diesem Grund wurde Zyxin nach dem griechischen Wort "zeuxis", welches "Verbindung" bedeutet benannt. Im Western Blot erkannte dieses Serum auf Extrakten von Hühnerembryo-Fibroblasten ein 82 kDa Protein (Beckerle, 1986). Zyxin wurde zuerst aus dem Huhn biochemisch aufgereinigt (Crawford and Beckerle, 1991) und kloniert (Sadler et al., 1992). Später wurde auch das humane und murine Zyxin kloniert und durch Northern Blot Analyse gezeigt, daß das humane Zyxin ubiquitär exprimiert wird (Wang et al., 1994; Macalma et al., 1996; Zumbunn and Trueb, 1996). Die Aminosäuresequenz des Zyxins aus dem Huhn ist 542 Aminosäuren lang, während die humanen (572 aa) und murinen (564 aa) Sequenzen etwas länger sind. In ihrer Domänenstruktur ist das Zyxin der verschiedenen Spezies stark konserviert (siehe **Abbildung 1**). In der humanen und murinen Sequenz findet man einen zusätzlichen, glutaminreichen Einschub von 37 Aminosäuren (Macalma et al., 1996).

An den prolinreichen Aminoterminus von Zyxin binden VASP (Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein) (Reinhard et al., 1995), Mena (Mammalian enabled) (Gertler et al., 1996) und Vav, ein Guanin-Nukleotid Austauschfaktor für Rho GTPasen (Olson et al., 1996; Hobert et al., 1996). Auch α -Aktinin, ein 100 kDa Protein, das antiparallele Homodimere bildet und damit Aktinfilamente quervernetzen kann, bindet mit seiner globulären Kopfdomäne an den Aminoterminus von Zyxin (Crawford et al., 1992). Im Carboxyterminus findet sich ein potentielles Kernexportsignal (Nix and Beckerle, 1997), gefolgt von drei Motiven mit

sogenannten "Zink Fingern", die LIM-Domänen genannt werden. Die Abkürzung LIM kommt von den Anfangsbuchstaben der ersten drei Proteine, die mit diesen Domänen entdeckt wurden: Lin-11, Isl-1 und Mec-3 (Freyd et al., 1990). Die LIM-Domäne ist ein Cystein- und Histidinreiches Motiv von ungefähr 60 Aminosäuren, die zwei "Zink Finger" bilden, indem jeweils zwei Zinkatome von je drei Cysteinresten und einem Histidin koordiniert werden (Sadler et al., 1992). Es wurde für Zyxin gezeigt, daß LIM-Domänen spezifische Protein-Protein Interaktionen eingehen können (Schmeichel and Beckerle, 1994). Über eine seiner LIM-Domänen bindet Zyxin an CRP1 (für Cysteine-rich Protein 1), ein 23 kDa großes Protein, das ebenfalls zwei LIM-Domänen enthält und mit Zyxin in den fokalen Kontaktpunkten kolokalisiert ist (Sadler et al., 1992). CRP1 ist ein hochkonserviertes Protein, das gewebsspezifisch und in einem zeitlich regulierten Muster während der Embryogenese exprimiert wird (Crawford et al., 1994). CRP1 gehört zu einer Proteinfamilie, zu der auch CRP2 und CRP3/MLP (für Muscle LIM Protein) gehören und die eine gleiche Domänenstruktur und ähnliche Sequenzen aufweisen, wobei für CRP3/MLP eine entscheidende Rolle während der Differenzierung von Muskelzellen nachgewiesen werden konnte (Arber et al., 1994).

Aufgrund der bekannten Bindungspartner und seiner Domänenstruktur wurde für Zyxin postuliert, daß es sowohl für die örtlichen Kontrolle der Aktinpolymerisation (Golsteyn et al., 1997), als auch für Signaltransduktionswege während der Zelldifferenzierung wichtig ist (siehe Übersichtsartikel: Beckerle, 1997; Beckerle, 1998).



Bindungsstellen der EVH 1 Domäne der Ena/VASP Proteinfamilie

Abbildung 1: Schematische Übersicht der Domänenstruktur des humanen Zyxins: Im Aminoterminus finden sich prolinreiche Sequenzen, die als Bindungsstellen der EVH1-Domäne

der Ena/VASP Proteinfamilie fungieren. Ebenso binden auch Vav und α -Actinin im aminoterminalen Bereich des Zyxins. Im Carboxyterminus findet sich ein potentiellles Kernexportsignal, das von drei Motiven mit "Zink Fingern" gefolgt ist, die LIM Domänen genannt werden.

Vinculin

Vinculin findet sich sowohl in Zell-Zell-, als auch in Zell-Matrix-Kontakten (Referenzen siehe Übersichtsartikel: Jockusch and Rüdiger, 1996). Es interagiert *in vitro* mit einer Vielzahl von Proteinen, die in den Proteinkomplexen auf der zytoplasmatischen Seite der Kontakte vorkommen: F-Aktin, α -Actinin, Talin, VASP und Paxillin. Vinculin besteht aus zwei Domänen, einer globulären "Kopf"-Domäne und einer stabförmigen Domäne. Diese beiden können miteinander interagieren und so Bindungsstellen für weitere Proteine maskieren. Auf diese Weise kann die Bindung von Vinculin mit anderen Proteinen reguliert werden. Es wird angenommen, daß die Regulation durch Phosphorylierung, durch die Bindung der verschiedenen Proteinliganden und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) erfolgen kann, wobei dieses wahrscheinlich ein kooperativer Prozess ist. Kürzlich wurde gezeigt, daß PtdIns(4,5)P₂ auf diese Weise die Bindung zwischen VASP und Vinculin regulieren kann (Hüttelmeier et al., 1998).

2.7 Regulation der Zellbewegung durch Signaltransduktionswege

Zellbewegung beginnt mit der Entwicklung von Zellschichten während der Gastrulation und ist während der ganzen Embryonalentwicklung für viele Prozesse, einschließlich der Entwicklung des zentralen Nervensystems entscheidend. Die Entstehung dieser komplexen Strukturen und die koordinierte Zellbewegung, die zur Entstehung von Geweben führt, erfordert eine verlässliche Weitergabe von extrazellulären Signalen an das Zytoskelett.

2.7.1 Regulation durch Lipid "second messenger"

Ein Teil der Weitergabe von extrazellulären Signalen an das Aktin-Zytoskelett könnte durch Lipid "second messenger" erfolgen. Lipid "second messenger" können aus Membranphospholipiden durch die Enzyme Phospholipase C (PLC), Phosphoinositid-3-OH Kinase (PI(3)K) und weitere spezifische Kinasen und Phosphatasen entstehen (siehe **Abbildung 2**).

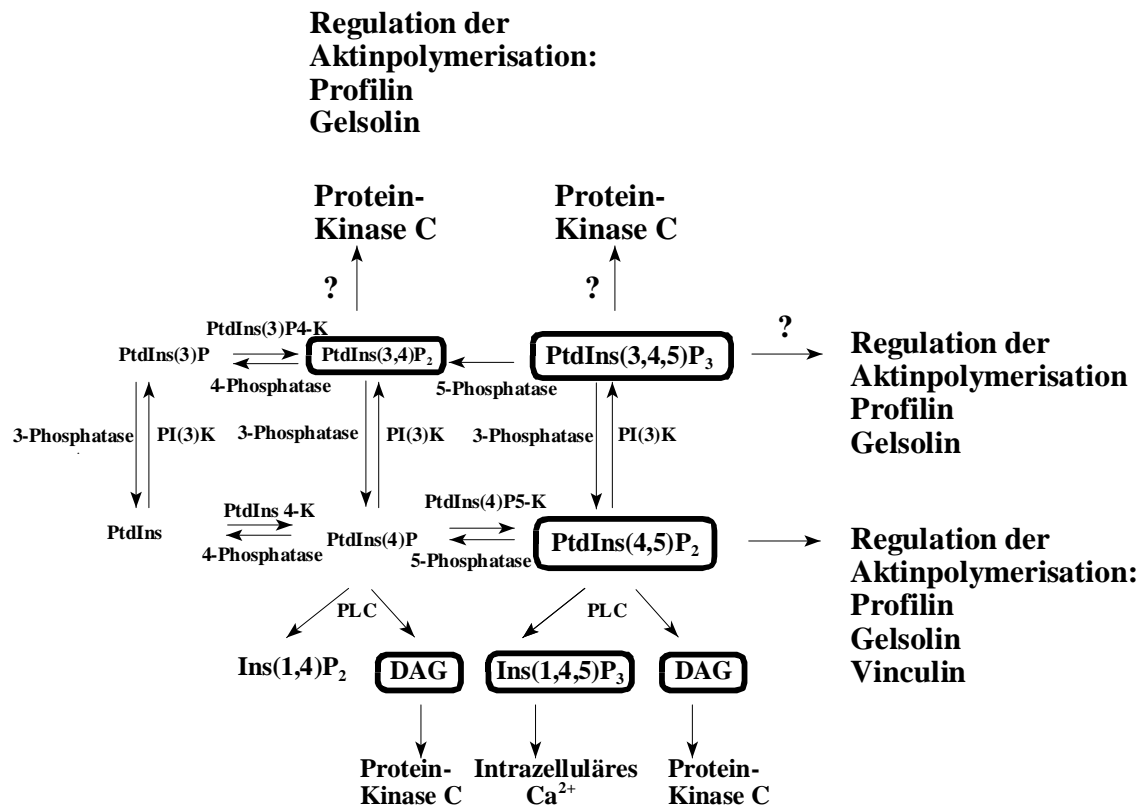


Abbildung 2: Übersicht über die Phosphoinositid-Synthese (verändert nach einer Abbildung aus Toker and Cantley, 1997): Die Enzyme, die die verschiedenen Phosphoinositide synthetisieren sind die Phosphatidylinositol 4-Kinase (PtdIns 4-K), Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase (PtdIns(4)P 5-K), Phosphatidylinositol-3-phosphat 4-Kinase (PtdIns(3) 4-K), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI(3)K) und die entsprechenden Phosphatasen. Von besonderer Bedeutung ist PtdIns(4,5)P₂, da die Phospholipase C (PLC) es zu den beiden "second messengern" Diacylglycerol (DAG) und Inositol (1,4,5) trisphosphat (Ins(1,4,5)P₃) hydrolysiert. PtdIns(4,5)P₂ und die beiden Produkte der PI(3)K PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ können aber auch selbst als "second messenger" fungieren und sind wahrscheinlich an der Regulation der Aktinpolymerisation beteiligt.

So reguliert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) die Funktion von Profilin (siehe Übersichtsarbeit: Schlüter et al., 1997), Gelsolin (siehe Übersichtsarbeit. Schafer and Cooper, 1995) und Vinculin (Hüttelmaier et al., 1998). Die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ durch die Phospholipase C (PLC) führt zu den Produkten Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (Ins(1,4,5)P₃), wovon DAG die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) verstärkt und Ins(1,4,5)P₃ die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht.

Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wiederum hat auch einen Einfluß auf die Aktinpolymerisation (siehe 2.7.2).

Die Produkte der PI(3)Kinase, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃, binden auch einige Proteine, welche die Aktinpolymerisation regulieren, wie z.B. Profilin und Gelsolin, und

regulieren deren Aktivität. Die Bindung an PH Domänen von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren könnte die von der PI(3) Kinase abhängige Aktivierung von Rac in Fibroblasten erklären (siehe Übersichtsartikel: Toker and Cantley, 1997).

2.7.2 Regulation durch Ca^{2+}

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit vieler Aktin-bindender Proteine stellt eine weitere Regulationsmöglichkeit des Aktinzytoskeletts dar. So wird die Funktion von Gelsolin, Formin, Severin, Adseverin/Scinderin, CapG und Villin durch Ca^{2+} reguliert (siehe Übersichtsartikel: Schafer and Cooper, 1995).

2.7.3 Regulation durch Rho GTPasen

Es hat sich gezeigt, daß die Rho Familie der kleinen GTPasen Schlüsselregulatoren des Zytoskeletts sind und die Gentranskription und die Zellproliferation beeinflussen (siehe Referenzen im Übersichtsartikel: Hall, 1998; Aspenström, 1999).

Die Rho GTPasen sind "molekulare Schalter", die eine aktive GTP-gebundene und eine inaktive GDP-gebundene Form haben. Der Zustand dieses "Schalters" wird durch drei Klassen von Proteinen reguliert. Die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) erleichtern den Austausch von GDP zu GTP, die GTPase aktivierenden Proteine (GAP) beschleunigen die Hydrolyseaktivität der GTPasen und die GDP Dissoziationsinhibitoren (GDI) inhibieren die Dissoziation des GDP von der GTPase.

Die Rho GTPase Familie besteht mittlerweile aus 14 Mitgliedern, wobei die am besten charakterisierten Proteine RhoA, Rac und CDC42 sind. Die Rho GTPasen fungieren als "molekulare Schalter" in Signaltransduktionswegen, die Membranrezeptoren mit dem Zytoskelett verbinden. So führt die Bindung von LPA (für "Lysophosphatidic acid") über die Bindung an einen Membranrezeptor über eine unbekannte Signalkaskade zur Aktivierung von Rho und damit zur Bildung von Stressfasern und fokalen Kontaktpunkten. Die Bindung eines Liganden aktiviert die Tyrosinkinase-Aktivität des PDGF-Rezeptors. Dies führt unter anderem zur Hydrolyse von Phospholipiden und zur Aktivierung von Rac und damit zu Bildung von Lamellipodien. Schließlich bewirkt der extrazelluläre Ligand Bradykinin die Aktivierung von CDC42 und damit die Bildung von Filopodien (siehe Übersichtsartikel: Zigmond, 1996).

Effektoren für CDC42 und Rac

Einer der ersten entdeckten Bindungspartner für CDC42 ist das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein, WASP (Aspenström et al., 1996; Kolluri et al., 1996; Symons et al., 1996). Durch die

Transfektion von WASP in epithelialen Zellen wurde gezeigt, daß es in der Signalkaskade unterhalb von CDC42 an der Regulation der Aktinpolymerisation beteiligt ist. Dies bewirkte eine Kolokalisation von WASP mit F-Aktin im Zytoplasma (Symons et al., 1996). WASP kommt aber nur in hämatopoietischen Zellen vor. Ein weitverbreitetes WASP verwandtes Protein ist N-WASP ("Neuronales-WASP"), das direkt mit G-Aktin (Miki and Takenawa, 1998), Profilin (Suetsugu et al., 1998) und PtdIns(4,5)P₂ (Miki et al., 1996) interagiert und dessen Überexpression in COS Zellen zur Filopodienbildung führt (Miki et al., 1998).

Die p21-activated kinase (PAK) Familie sind Effektoren für Rac und CDC42, denen sowohl eine Rolle in der Regulation der Aktinpolymerisation, als auch in der JNK/SAPK (Jun amino-terminal kinase/stress-activated protein kinase) Signalkaskade zugeschrieben wird. So induzierte PAK1 Lamellipodien und Filopodien, wenn es in Fibroblasten mikroinjiziert wurde (Sells et al., 1996).

Eine weitere Serin/Threonin Kinase in der Signaltransduktion unterhalb von Rac ist die LIM Kinase 1, die Cofilin in Abhängigkeit von Rac am Serin 3 phosphoryliert, wodurch die Aktivität von Cofilin, F-Aktin zu depolymerisieren, inhibiert wird (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). MRCK (Myotonic dystrophy kinase-related CDC42 binding protein kinase) ist eine Serin/Threonin Kinase, welche die Aktomyosin Kontraktilität durch die Phosphorylierung der "Non-Muscle Myosin light chain" beeinflussen kann (siehe Übersichtsartikel: Aspenström, 1999).

Effektoren für Rho

Die FH (Formin homology domain) Proteine sind eine äußerst wichtige Verbindung zwischen Rho und dem Aktin-Zytoskelett (siehe Übersichtsartikel: Wassermann, 1998). Das FH Protein p140mDia, das homologe Protein des *Drosophila* Proteins Diaphanous aus der Maus, bindet an aktiviertes RhoA und Profilin und kolokalisiert mit diesen in Lamellipodien von Fibroblasten. Überexpression von p140mDia in COS Zellen führte zu einer Akkumulation von F-Aktin (Watanabe et al., 1997). Generell spielen die Proteine der wachsenden Familie der FH-Proteine in mehreren eukaryoten Organismen, wie *Drosophila*, *Caenorabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, eine Rolle in der Ausbildung des kontraktilen Aktomyosinringes während der Zytokinese und in der Aktin-abhängigen Zellpolarität. Die Entdeckung, daß eine Mutation im humanen homologen Protein des Diaphanous verantwortlich für eine genetisch bedingten Taubheit ist, zeigt, daß die FH Proteine noch weitere Funktionen in der Regulation des Aktinzytoskeletts innehaben könnten (siehe Übersichtsartikel: Wasserman, 1998).

Die Familie der Rho Serin/Threonin Kinasen (ROCK) interagiert mit aktiviertem Rho, und es konnte gezeigt werden, daß sie sich, wenn sie überexprimiert werden, wie aktiviertes Rho

verhalten und damit die Bildung von Stressfasern und fokalen Kontaktpunkten induzieren. Bisher sind alle bekannten Substrate für diese Kinasen Bestandteile des Zytoskeletts, wie die Myosin-bindenden Untereinheiten der Myosin Phosphatase und die MLC (Myosin light chain), wobei beide die Aktivität von Myosin II regulieren, das für die Kontraktilität der Stressfasern verantwortlich ist (siehe Übersichtsarbeit: Tapon and Hall, 1997).

Wie unter **2.7.1** ausgeführt, ist PtdIns(4,5)P₂ ein wichtiger "Second messenger", der an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist, indem er die Funktion einiger Aktin-bindender Proteine reguliert. Eines der Enzyme, das an seiner Bildung beteiligt ist, Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase, wird durch RhoA reguliert (siehe Übersichtsartikel: Aspenström, 1999).

2.7.4 Abl und Ena

Die zeitliche und räumliche Regulation der Zellbewegung wird durch die koordinierte Arbeit vieler Signaltransduktionskaskaden erreicht, wobei oft Tyrosinkinasen beteiligt sind.

An einer dieser Signaltransduktionskaskaden ist die Tyrosinkinase c-Abl beteiligt, die direkt an monomeres und filamentöses Aktin binden kann (Van Etten et al., 1994). Eine chromosomale Translokation zwischen der c-abl Tyrosinkinase und dem BCR Genprodukt führt zur Bildung des BCR/ABL Fusionsproteins, das in 95% der Patienten gefunden wird, die an Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) leiden. Zellen, die BCR/ABL exprimieren haben eine stark verstärkte Motilität, vermehrt Membran-ruffles und die Eigenschaft lange Filopodien zu bilden, was vermuten läßt, daß eine veränderte aktinvermittelte Zellbewegung zur Pathogenese der CML beiträgt (Salgia et al., 1997).

In *Drosophila* wurde das *Drosophila* Abl Protein intensiv untersucht und gezeigt, daß Defekte, die durch den Verlust von *abl* entstehen durch Mutationen im Enabled (*ena*) Gen aufgehoben werden können (Gertler et al., 1990). Ena wird *in vitro* von der SH3 (Src homology 3) Domäne von Abl und Src gebunden, kolokalisiert mit Abl in Axonen des zentralen Nervensystems, wird *in vivo* an Tyrosinen phosphoryliert und könnte dadurch negativ reguliert werden (Gertler et al., 1995).

2.7.5 Mena, VASP und Evl

Das Säugerhomolog von Ena ist Mena (mammalian enabled) und ist mit zwei anderen eukaryoten Proteinen VASP (Halbrügge and Walter, 1989) und EVL verwandt (Gertler et al., 1996). Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP) wurde als Substrat für cyclo-Nukleotid-abhängige Kinasen in Thrombozyten identifiziert (Halbrügge and Walter, 1989) und findet sich in fokalen Kontaktpunkten, Stressfasern und an Orten dynamischer

Aktinreorganisation, wie Lamellipodien (Reinhard et al., 1992). VASP und Mena binden sowohl die fokalen Kontaktproteine Zyxin (Gertler et al., 1996; Niebuhr et al., 1997), Vinculin (Brindle et al., 1996; Reinhard et al., 1996) und das Oberflächenprotein des fakultativ intrazellulären Pathogens *Listeria monocytogenes*, ActA (Chakraborty et al., 1995), als auch an Profilin (Gertler et al., 1996; Reinhard et al., 1995). VASP wird durch cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinasen *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert (Halbrügge et al., 1990) und dies korreliert sehr gut mit einer Hemmung der Thrombozyten durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen (Nolte et al., 1991). VASP liegt somit an einem Konvergenzpunkt zweier inhibitorischer Signaltransduktionswege und dem Zytoskelett. Mena und VASP können damit als potentielle Regulatoren der Zellbewegung angesehen werden.

Die Ena/VASP Familie

Das Alignment der Aminosäuresequenzen von Mena, VASP und Ena-VASP Like (EVL), der "Ena/VASP Protein-Familie", zeigt, daß diese Proteine eine verwandte Domänenstruktur besitzen. Am Aminoterminus liegt die Ena-VASP-Homologie1 (EVH1) Domäne, gefolgt von einer prolinreichen und einer Ena-VASP-Homologie 2 (EVH2) Domäne (Gertler et al., 1996).

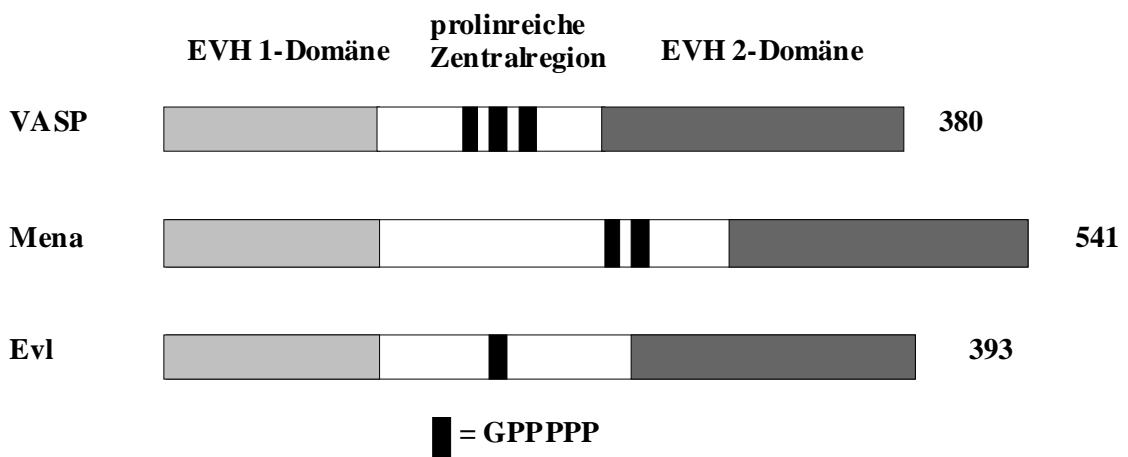


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Primärsequenz der Proteine VASP, Mena und Evl. Der dreigeteilte Aufbau aus aminoterminaler EVH 1- Domäne, zentraler prolinreicher Region und carboxyterminaler EVH 2-Domäne ist diesen Proteinen gemeinsam. Zusätzlich zu den hier eingezeichneten GPPPPP-Motiven enthalten die Zentralregionen der Proteine noch weitere prolinreiche Sequenzen, die Modifikationen des GPPPPP-Motivs entsprechen.

2.8 *Listeria monocytogenes*: Ein Modellsystem der Aktinpolymerisation

Listeria monocytogenes ist ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, das über kontaminierte Nahrungsmittel Menschen und Tiere infizieren kann. Die so hervorgerufene, sogenannte Listeriose kann der Auslöser einer Meningitis in gefährdeten Personen mit einem geschwächten Immunsystem sein. Da der Erreger neben der Blut-Hirn-Schranke auch die "Plazenta-Barriere" überwinden kann, kann eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* auch zu embryonalen Mißbildungen und Fehlgeburten führen (siehe Übersichtsartikel: Chakraborty und Wehland, 1997).

Listeria monocytogenes hat sich in den vergangenen Jahren zu einem Modellsystem entwickelt, um die Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt auf molekularer Ebene zu analysieren. Die Identifizierung und Charakterisierung der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren zeigt, daß pathogene Listerien (*L.monocytogenes* und *L.ivanovii*) effiziente Mechanismen entwickelt haben, die es ihnen ermöglichen, nicht nur in das Zytoplasma der Wirtszelle einzudringen, sondern sich auch im Wirtsorganismus auszubreiten (Referenzen in Sheehan et al., 1994 und Chakraborty und Wehland, 1997). Insbesondere zeichnen diesen bakteriellen Erreger drei Pathogenitätsmechanismen aus: die Fähigkeiten a) nicht phagozytierende Zellen zu infizieren, b) das phagosomale Kompartiment zu lysieren und c) unter Inanspruchnahme von Zytoskelettkomponenten sich innerhalb des Zytoplasmas der infizierten Zelle zu bewegen und sich von Zelle zu Zelle auszubreiten, ohne mit dem extrazellulären Milieu in Kontakt zu kommen.

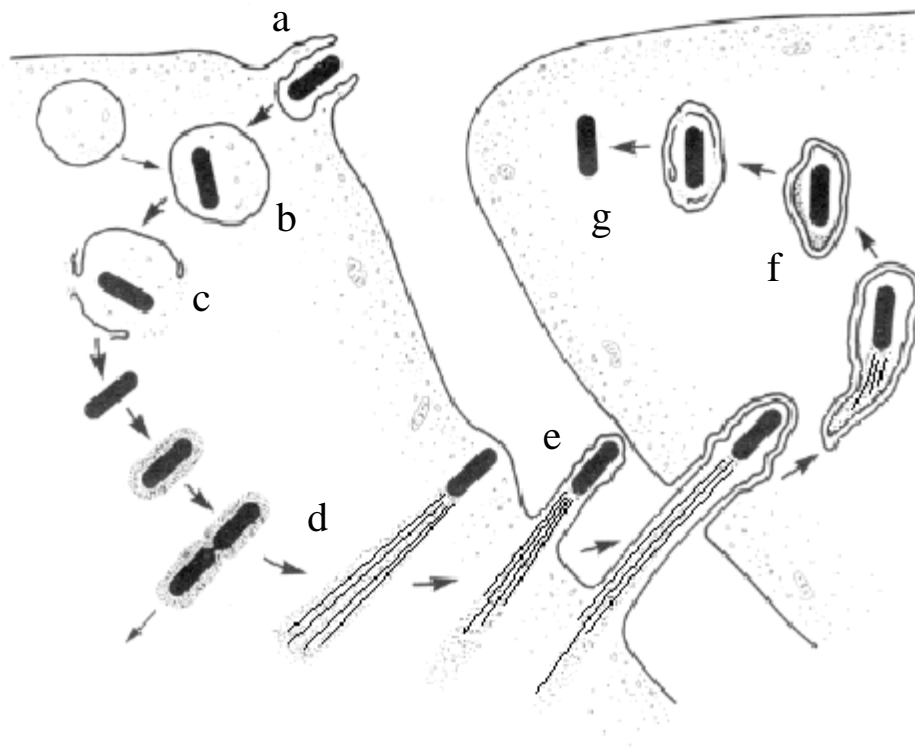


Abbildung 4: Infektionszyklus des fakultativ intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes*: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen des Infektionsverlaufs: Invasion (a+b), intra- und interzelluläre Ausbreitung (c-g) (Nach Tilney and Portnoy, 1989).

Jeder dieser drei Pathogenitätsmechanismen spiegelt eine raffinierte Adaptation des Erregers an die Wirtszelle wider: die Adhäsion und die Invasion von nicht phagozytierenden Zellen nutzen Signaltransduktionskaskaden der Wirtszelle aus, die zu einer lokalen Aktivierung membranständiger Zytoskelettkomponenten führen, welche die Aufnahme des Erregers bewerkstelligen. An diesen Vorgängen sind die listeriellen Internalinproteine (InlA und InlB) beteiligt (Gaillard et al., 1991; Lingnau et al., 1995). Außerdem wurde E-Cadherin als Wirtszellrezeptor des InlA identifiziert (Mengoud et al., 1996). Essentiell für die Pathogenität von Listerien ist das Listeriolysin, ein sekretierter hämolytischer Faktor, der die Membranen phagosomaler Vakuolen lysiert, so daß Listerien in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen (Referenzen in Sheehan et al., 1994 und Chakraborty und Wehland, 1997). Normalerweise unbeweglich rekrutieren intrazelluläre Listerien Aktinfilamente auf ihrer Oberfläche, die zu einer schweifartigen Struktur an einem Bakterienpol umgelagert werden. Hierauf beginnen die Listerien sich im Zytoplasma der Wirtszelle zu bewegen, um bei Kontakt mit der Plasmamembran Ausstülpungen zu induzieren, die von benachbarten Zellen aufgenommen werden, was eine direkte Übertragung des Erregers zur Folge hat. Das auf der

Bakterienoberfläche exponierte ActA von *L.monocytogenes* bzw. iActA von *L.ivanovii* ist an diesen Vorgängen ursächlich beteiligt (Domann et al., 1992; Kocks et al., 1992; Gerstel et al., 1996).

Die aktinabhängige Bewegung des intrazellulären Bakteriums, *Listeria monocytogenes*, erinnert stark an die Verlängerung von Aktinfilamentbündeln in Filopodien und Lamellipodien, wo man auch die gleiche Orientierung und Anordnung der Aktinfilamente findet (Sechi et al., 1997) (siehe **Abbildung 5**).

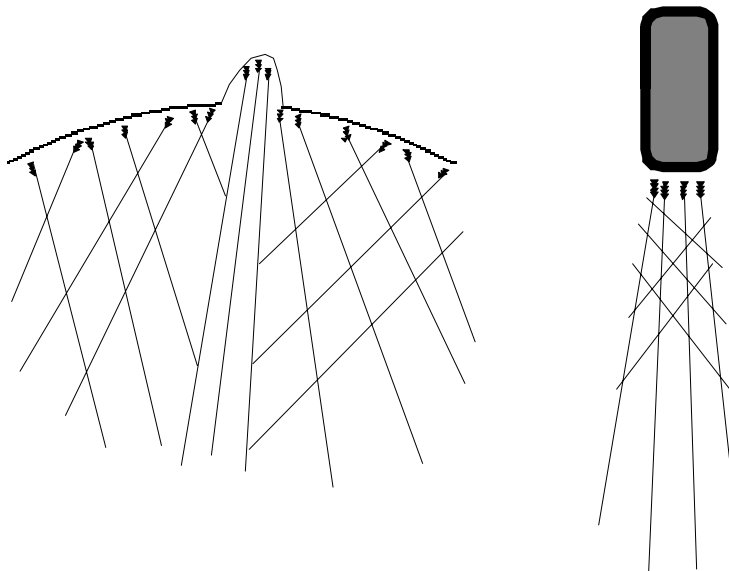


Abbildung 5: Schematischer Vergleich der Anordnung der Aktinfilamente in Lamellipodien, Filopodien und im Aktin-'Schweif' von *Listeria monocytogenes*. Auf der linken Seite ist ein Lamellipodium und ein Filopodium und auf der rechten Seite ein Listerium mit einem Aktin-'Schweif' gezeigt. Die schnellwachsenden Plusenden sind durch schwarze Dreiecke symbolisiert, die Aktinfilamente durch gerade Linien.

Diese örtlich begrenzte Aktinpolymerisation bewirkt eine gerichtete Kraft, die das Bakterium vorwärts treibt. Da die Listerienbewegung nur ein bakterielles Protein, ActA, benötigt und in zellfreien Systemen rekonstituiert werden kann, hat sie sich zu einem nützlichen, einfachen Modell der aktinvermittelten Zellbewegung entwickelt.

Mit einem dieser zellfreien Systeme (Thrombozytenextrakte) wurde der humane Arp2/3 Komplex als essentieller zellulärer Faktor der Listerienbewegung identifiziert (Welch et al., 1997).

2.9 Molekulare Analyse des ActA Proteins

Insertions- und Transposonmutagenese ermöglichte die Identifizierung des ActA Gens, das für 639 Aminosäuren kodiert (Domann et al., 1992; Kocks et al., 1992). Der aminoterminaler Teil und die zentrale prolinreiche "Repeat"-Domäne sind auf der Bakterienoberfläche exponiert, das hydrophobe carboxyterminale Ende verankert das Protein in der bakteriellen Membran (siehe **Abbildung 7**). Verschiedene experimentelle Ansätze zeigten, daß das ActA als alleiniger Faktor für die aktinvermittelte Listerienbewegung verantwortlich ist (Pistor et al., 1994 und 1995; Kocks et al., 1995; Lasa et al., 1995). Detailliertere Analysen zeigten weiterhin, daß das ActA mindestens zwei (Lasa et al., 1995; Pistor et al., 1995) eventuell drei (Lasa et al., 1997) funktionelle und für die Aktinfilamentrekrutierung wichtige Regionen enthält.

Innerhalb des aminoterminalen Teils konnte der Bereich, der für die Aktinfilamentnukleation nötig ist, auf 23 Aminosäuren eingegrenzt werden, während die prolinreiche "Repeat"-Domäne für die effiziente Aktinfilamentrekrutierung entscheidend ist (Pistor et al., 1995). Bisher konnten nur zwei Wirtszellproteine identifiziert werden, die direkt mit ActA interagieren und an die zentrale prolinreiche "Repeat" Region binden: Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) (Chakraborty et al., 1995) und mammalian Enabled (Mena), das Säugerhomolog von Drosophila Enabled (Ena) (Gertler et al., 1996).

Eine genauere Untersuchung von VASP und Mena zeigte, daß die aminoternale EVH-1 (Ena-VASP-Homology-1) Domäne an ein neues spezifisches prolinreiches Motiv bindet, das viermal im ActA wiederholt wird (Niebuhr et al., 1997). Analoge Motive sind auch in den Mikrofilament-assoziierten und fokalen Kontaktproteinen Vinculin und Zyxin für die Bindung und Lokalisation von VASP/Mena in der eukaryotischen Zelle verantwortlich. Sowohl VASP als auch Mena binden Profilin (Reinhard et al., 1995; Gertler et al., 1996), welches wiederum einen Komplex mit monomerem Aktin bildet. Somit könnte über die VASP/Mena-Rekrutierung die Konzentration von polymerisationsfähigem Aktin in unmittelbarer Nähe der aminoterminalen ActA-Domäne erhöht werden. Denn durch Profilin vermittelten Austausch von ADP gegen ATP im G-Aktin wird polymerisationskompetentes G-Aktin zur Verfügung gestellt. Beide Mechanismen verstärken die ActA-vermittelte Bildung von Aktinfilamenten wesentlich und könnten dadurch das bakterielle System sehr effizient machen.

Erstaunlicherweise verlangsamte die Deletion der prolinreichen VASP/Mena Bindungsstelle im ActA nur die Bewegung der Listerien, verhinderte aber nicht die Aktinpolymerisation (Pistor et al., 1995; Niebuhr et al., 1997). Dies führte zu der Modellvorstellung, daß der Aminoterminus von ActA für die Nukleation neuer Aktinfilamente verantwortlich ist, während die Prolin "Repeats" über die Rekrutierung von VASP, und damit Profilaktin, die Aktinpolymerisation an den neu gebildeten Aktinfilamenten beschleunigen.

Letztere Ergebnisse zeigen auf molekularer Ebene ein perfektes Beispiel für "Molekulare Mimikry" eines pathogenen Bakteriums. Sequenzhomologien zwischen ActA, Zyxin und Vinculin beschränken sich auf die prolinreichen Sequenzen. Die zweite funktionelle Domäne im aminoterminalen ActA-Bereich, die für die Aktinnukleation essentiell ist, fehlt diesen Zytoskelettproteinen, während diese Domäne im iActA aus *L. ivanovii* konserviert ist (Gerstel et al., 1996). Daher liegt die Vermutung nahe, daß das Vorhandensein beider Domänen im ActA Voraussetzung für die effiziente Aktinnukleation ist. In den eukaryotischen Zellen könnten verschiedene Moleküle diese Domänen enthalten, so daß eine Zelle die Möglichkeit hat, den Aktinnukleationsprozess zu kontrollieren, indem die entsprechenden Proteine in einen Komplex rekrutiert werden.

All diese Untersuchungen zeigen, daß es sehr starke Analogien zwischen der aktinvermittelten Zellbewegung und der intrazellulären Listerienbewegung auf molekularer Ebene gibt. In beiden Fällen findet die Einlagerung von Aktinmonomeren an der Zell- bzw. Bakterienmembran statt. Die Aktinpolymerisation ist die treibende Kraft sowohl für die Ausbreitung der Lamellipodien in motilen Regionen einer normalen Zelle, als auch für die intrazelluläre Listerienbewegung. Die Listerien imitieren in einer Art "Molekularem Mimikry" die Proteindomänen der Zelle, die für die Aktinnukleation und -polymerisation nötig sind und vereinen diese auf einem Protein, dem ActA, und entziehen diesen Prozess den normalen Regulationsmechanismen der Wirtszelle. Die starken Analogien zwischen dem Listerienmodell und Lamellipodien lassen erwarten, daß es ActA-analoge zelluläre Proteine gibt und diese eine entscheidende Rolle bei der Aktinpolymerisation spielen.

2.10 Charakterisierung der EVH-1 Domäne

VASP (Chakraborty et al., 1995) und Mena (Gertler et al., 1996) wurden als ActA Bindungspartner charakterisiert. Die molekulare Analyse der prolinreichen ActA-Sequenzen zeigte, daß sie ein neues prolinreiches Bindungsmotiv darstellen, die auch in den Zytoskelettproteinen Vinculin und Zyxin vorhanden sind. An dieses prolinreiche Bindungsmotiv, das sich von dem der SH3- und WW-Domänen unterscheidet, bindet die aminoterminal EVH1-Domäne von Mena und VASP (Gertler et al., 1996; Niebuhr et al., 1997).

Eine genauere Analyse der Aminosäuren in diesem Bindungsmotiv (E/DFPPPPXD/E) durch den Austausch einzelner Aminosäuren in einem Peptidscan und Overlay mit radioaktiv markiertem VASP und Mena zeigte, daß die zentralen vier Proline (Niebuhr et al., 1997) und die flankierenden sauren Aminosäuren (Carl et al., submitted) wichtig für die Bindung sind, wobei dem den Prolinen vorangestellten Phenylalanin eine entscheidende Rolle zukommt.

Eine chromosomale ActA Deletionsmutante, der die prolinreiche Repeatdomäne fehlt, kann nur noch sehr kurze Aktinschweife bilden. Hiermit konnte gezeigt werden, daß VASP und Mena tatsächlich die Aktinpolymerisation an Listerien beschleunigen können (Niebuhr et al., 1997; Smith et al., 1996).

<i>Listeria monocytogenes</i>	SD <u>FPPPP</u> TDEELRL
ActA	FE <u>FPPPP</u> TDEELRL
	FE <u>FPPPP</u> TEDELEI
	SD <u>FPIIP</u> TEEEELNG
<i>Listeria ivanovii</i> iActA	LE <u>FPSPP</u> TEEEELAA
	LE <u>FPSPP</u> TEEEELAA
	LE <u>FPSPP</u> TEEEELAA
	LE <u>FPSPP</u> TEEEELAA
	LE <u>FPSPP</u> TEEEELAA
	LE <u>FPSPP</u> TEEEELAA
	LE <u>FPSPP</u> TRAELAA
Humanes Vinculin	PD <u>FPPPP</u> PDLEQLR
Hühner Vinculin	PD <u>FPPPP</u> PDLEHLH
Humanes Zyxin	ED <u>FPLPP</u> PPLAGDG
	GA <u>FPPPP</u> PPMIIEEP
	ES <u>FPPAP</u> LEEEIFP
	EI <u>FPSPP</u> PPPEEEG
Murines Zyxin	ED <u>FPLPP</u> PPLIGEG
(Accession # X99063)	GA <u>FPPPP</u> PPMIIEEP
	ES <u>FPPAP</u> LEEDIFP
	DI <u>FPSPP</u> PPPEEEG
Hühner Zyxin	EEL <u>LPLPP</u> PPPPGEE
	CA <u>FPPPP</u> PPFEEPF
	EP <u>FPPAP</u> DEAFSP
	EA <u>FPSPP</u> PPPPPMF

Abbildung 6: Sequenzvergleich der EVH1 Bindungsstellen im *Listeria monocytogenes*, *ivanovii* ActA und in den fokalen Kontaktproteinen Zyxin und Vinculin aus verschiedenen Spezies.

2.11 WASP, SCAR und der Arp2/3 Komplex

Der Arp (= Actin Related Protein) 2/3 Komplex, ein aus sieben Untereinheiten bestehender Komplex, hat eine entscheidende Bedeutung für die Aktinpolymerisation an *L. monocytogenes* (Welch et al., 1997 b). Der Arp2/3-Komplex wurde ursprünglich aus *Acanthamoeba* aufgrund seiner Bindung an Profilin isoliert (Machesky et al., 1994). Der Arp2/3 Komplex quervernetzt

Aktinfilamente *in vitro* und wird in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sowohl im gesamten listeriellen Aktinschweif, als auch in Lamellipodien gefunden, nicht jedoch in den weniger dynamischen Stressfasern (Welch et al., 1997 c; Machesky et al., 1997). Der Arp2/3 Komplex verstärkt die Geschwindigkeit der Aktinpolymerisation *in vitro*, während gereinigtes ActA alleine darauf keinen Einfluß hat. Wenn die aminoterminalen ActA Domäne, die für die Aktinfilamentbildung auf der Bakterienoberfläche verantwortlich ist, und gereinigter Arp2/3 Komplex *in vitro* zusammen mit G-Aktin inkubiert werden, wird dagegen der Prozess der Aktinnukleation bedeutend verstärkt (Welch et al., 1998). Eine direkte Bindung des Arp2/3 Komplexes an ein listeriell Protein konnte bisher nicht gezeigt werden.

Interessanterweise konnte der Carboxyterminus von WASP (siehe 2.7.3) und dem ihm verwandten humanen SCAR Protein als Bindungspartner der p21 Untereinheit des Arp2/3-Komplexes identifiziert werden (Machesky und Insall, 1998).

Das humane SCAR Protein ist identisch mit dem kürzlich beschriebenen Protein WAVE, welches in der Signaltransduktion unterhalb von Rac liegt, aber kein direkter Bindungspartner zu sein scheint (Miki et al., 1998 b). Im Gegensatz dazu ist WASP und N-WASP ein direkter Bindungspartner des aktivierten CDC42 (Symons et al., 1996; Miki et al., 1998a). Die ektopische Expression von WAVE/SCAR führt zu einer Profilin-abhängigen Ansammlung von F-Aktin, die aber nicht von der direkten Bindung von Profilin an WAVE/SCAR abhängig ist, aber von der G-Aktin bindenden sogenannten "Verprolin Homologie Region" die auch "WASP Homologie Region 2" (WH2) genannt wird. Endogenes WAVE/SCAR kolokalisiert in Membran-ruffles mit F-Aktin und mit transfiziertem konstitutiv-aktivem Rac und F-Aktin in so induzierten Lamellipodien (Miki et al., 1998 b).

SCAR (supressor of cAR), wurde ursprünglich als WASP-verwandtes Protein entdeckt, das den Phenotyp des Defektes des cAMP Rezeptors 2 (cAR 2) in der *Dictyostelium* Entwicklung unterdrückt (Bear et al., 1998). Während der *Dictyostelium* Entwicklung wirkt extrazelluläres cAMP als Botenstoff, der über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die chemotaktische Bewegung stimuliert. SCAR scheint ein negativer Regulator der cAMP Rezeptor 2 vermittelten Chemotaxis zu sein, da ein gleichzeitiger Defekt in SCAR den Defekt, der durch die Deletion des *cAR2* Gens entsteht, unterdrückt. Wenn nur das SCAR Gen deletiert wird, haben die *Dictyostelium* Zellen während des vegetativen Wachstums nur ungefähr 25 % ihrer normalen Größe und einen verringerten F-Aktin Gehalt. Während der chemotaktischen Zellwanderung zeigen sie eine abnorme Zellmorphologie und keine starke F-Aktin Ansammlung an der Frontlamelle, sondern pseudopodienartige Ausläufer, mit nur schwacher F-Aktin Konzentration, obwohl sie noch fähig zur chemotaktischen Zellwanderung sind (Bear et al., 1998).

Listeria Modellsystem

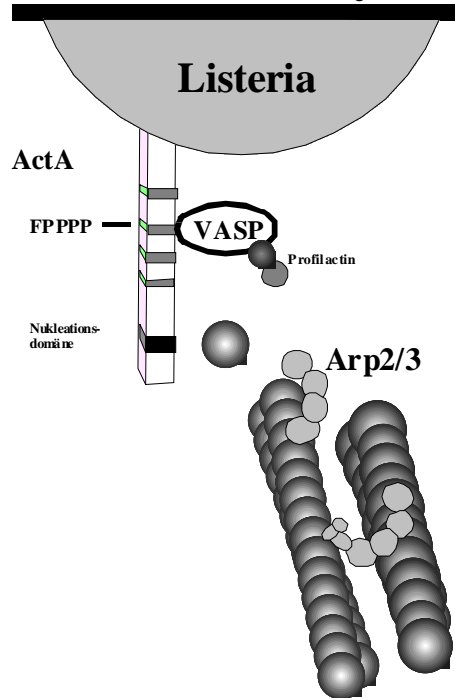


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Listeria Modell System: Gezeigt ist das Oberflächenprotein von *Listeria monocytogenes* ActA mit den prolinreichen Bindungsstellen der EVH1-Domäne der Proteine der Ena/VASP Familie und die Domäne, die für die Nukleationsaktivität von ActA verantwortlich gemacht wird. VASP, Profilaktin und der Arp2/3 Komplex sind zelluläre Faktoren, die an der Aktin-vermittelten Bewegung von Listerien beteiligt sind.

2.12 T-Zell Aktivierung und Reorganisation des Aktinzytoskeletts

Da ein zentraler Aspekt der hier vorliegenden Arbeit, die Untersuchung der Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der T-Zell Aktivierung umfasst, wird im folgenden eine kurze Einführung in die Thematik gegeben.

Die Signaltransduktionskaskade, die vom T-Zell Antigenrezeptor (TCR)/CD3-Komplex ausgeht und zum Zellkern und damit zur T-Zell Aktivierung, Zellproliferation und Interleukin-2 (IL-2) Sekretion führt, ist mit einer massiven Reorganisation des Zytoskeletts verknüpft. Über diese Signaltransduktionskaskade, die in T-Zellen als Antwort auf die Antigenpräsentation einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) abläuft, ist schon sehr viel bekannt: Eine Bindung an den T-

Zell Rezeptor führt zur Aktivierung von Lck und Fyn, zwei Mitgliedern der Src Familie der Protein-Tyrosinkinasen (PTK), die wiederum Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne der TCR ζ und CD3 Ketten phosphorylieren. Diese sogenannten "ITAM" (für "Immunereceptor Tyrosine based Activation Motif") werden dann von der SH2-Domäne von ZAP-70, einer Protein Tyrosinkinase aus der Syk Familie, gebunden.

Die Phosphorylierung des am TCR gebundenen ZAP-70 durch Lck oder Fyn führt zu seiner Aktivierung als Kinase (siehe Übersichtsartikel: Weiss and Littman, 1994). Aktiviertes ZAP-70 und/oder Lck und Fyn phosphorylieren eine Vielzahl von Adaptermolekülen, hauptsächlich Proteine von 36-38, 76 und 120/130 kDa.

Die SH2-Domäne von Vav bindet an den Aminoterminus von SLP-76 (für SH2-Domäne enthaltendes Leukozytenprotein von 76 kDa) (Jackman et al., 1995; Musci et al., 1997 b), dem 76 kDa großen, tyrosinphosphoryliertem Protein (Tuosto et al., 1996). Vav ist ein Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (GEF) für Rho GTPasen (Olson et al., 1996; Crespo et al., 1997; Han et al., 1997). Die zentrale prolinreiche Region von SLP-76 wird von der SH3-Domäne von Grb2 gebunden, einem SH3-SH2-SH3 Adapterprotein, welches zusätzlich an Sos bindet. Sos ist ein Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (GEF) für Ras, was zur Aktivierung der Ras/Raf-Signaltransduktionskaskade und damit zur Zellaktivierung führt (siehe Übersichtsartikel: Koretzky, 1997). Die carboxyterminale SH2-Domäne von SLP-76 ist verantwortlich für die Bindung an das tyrosinphosphorylierte Protein mit einem Molekulargewicht von 120/130 kDa, das Fyb (für Fyn bindendes Protein) (Da Silva et al., 1997) oder SLAP-130 (für SLP-76 assoziiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa) (Musci et al., 1997 a) genannt wurde. Eine transiente Überexpression von SLP-76 verstärkt die T-Zellrezeptor vermittelte NFAT (für "nuclear factor of activated T-cells") und IL-2 Promoter Aktivität. Dies läßt vermuten, daß SLP-76 eine entscheidende Rolle in der Verknüpfung des T-Zell Rezeptors mit späteren Ereignissen während der T-Zell Aktivierung einnimmt (Motto et al., 1996). Fyb/SLAP, das Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 120/130 kDa, wurde als Protein kloniert, das von der SH2-Domäne der Tyrosinkinase Fyn und der SH2-Domäne von SLP-76 gebunden wird. Fyb/SLAP enthält potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, mehrere potentielle prolinreiche Bindungsstellen für SH3-Domänen, zwei stark geladene Regionen und eine carboxyterminale potentielle SH3-ähnliche Domäne (Da Silva et al., 1997; Musci et al., 1997a).

Nach der Bindung einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) wird das Zytoskelett der T-Zelle zur gebundenen APC hin polarisiert. Dabei wird sowohl das Aktinzytoskelett durch die Polymerisation von F-Aktin an der T-Zell/APC Kontaktstelle umorganisiert, als auch das Tubulinzytoskelett durch die Reorientierung des Mikrotubuli orientierenden Zentrums (MTOC) zur APC (Kupfer et al., 1987).

T-Zell Polarisierung und Aktivierung sind verknüpft, da Cytochalasin, ein Pilzgift, das an Aktinfilamente bindet und die Polymerisation von F-Aktin verhindert, einen Effekt auf die T-Zell Proliferation von aktivierten T-Zellen hat (Geppert and Lipsky, 1990).

Obwohl sehr viel über die T-Zell Signaltransduktionskaskaden bekannt ist, die zur T-Zell Aktivierung und Transkription von bestimmten Genen führen, ist nicht bekannt, wie diese Signaltransduktion zur Polarisierung des Zytoskelett führt.

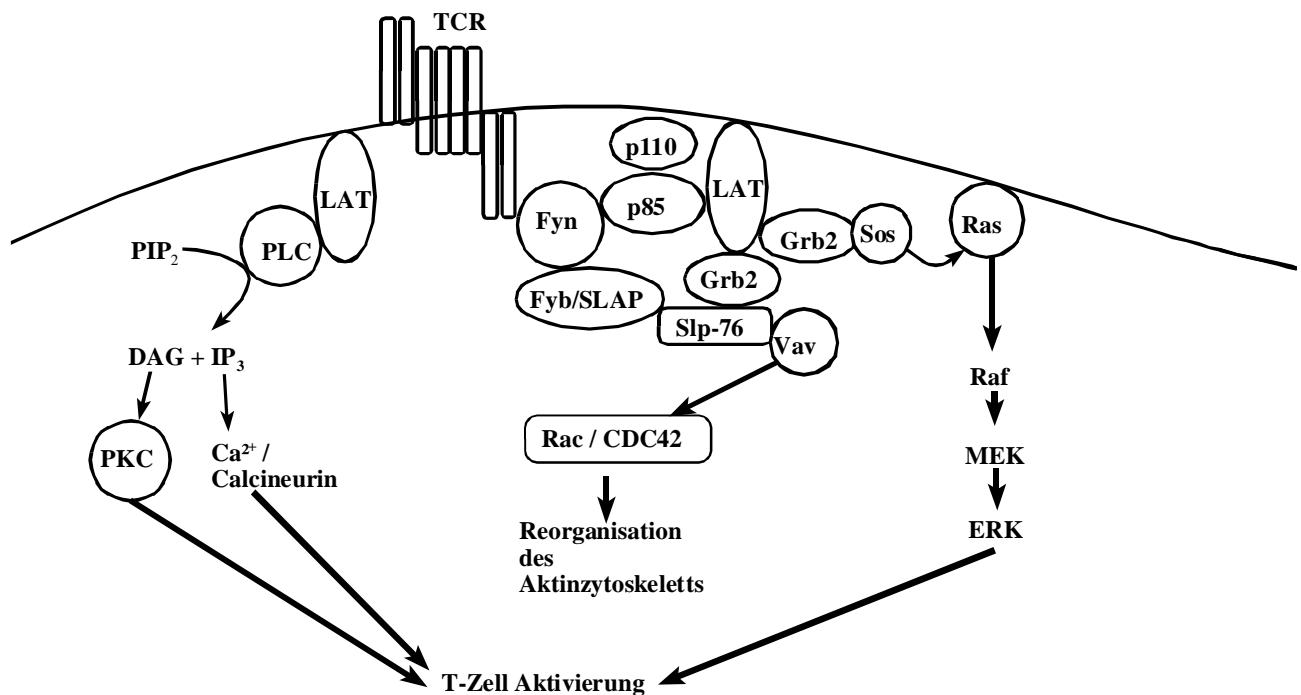


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege der T-Zell Aktivierung.

2.13 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der Doktorarbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe gerade die Bindung von VASP an ActA (Chakraborty et al., 1995) im Detail untersucht mit dem Ergebnis, daß die aminoterminalen EVH1-Domäne direkt an ein viermal im ActA wiederholtes prolinreiches Motiv (E/DFPPPPXDEE) bindet (Niebuhr et al., 1997), das auch in den fokalen Kontaktproteinen Zyxin und Vinculin gefunden wurde.

Es zeigte sich, daß die Bindung von VASP an dieses Motiv essentiell für die Beschleunigung der Aktinpolymerisation an den Listerien ist, da eine chromosomale ActA-Deletionsmutante, der die prolinreiche Repeatdomäne fehlt, nur noch sehr ineffizient Aktinfilamente rekrutieren kann.

Daher wurde angenommen, daß Proteine mit diesem Motiv durch die Rekrutierung von VASP eine ähnliche Rolle in eukaryoten Zellen, wie in der durch *Listeria monocytogenes* induzierten Aktinpolymerisation, spielen könnten.

Affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper, gegen das Peptid (SFEFPPPTDEELRL, Bindungsstelle der EVH1-Domäne im ActA), erkannten im Western Blot auf Totallysaten von HeLa-Zellen Zyxin, Vinculin und vier weitere Banden (Niebuhr et al., 1997).

Daher war zu erwarten, daß neben den bereits bekannten Proteinen, weitere bisher nicht identifizierte Proteine existieren, die dieses Prolin-reiche Motiv tragen.

Zwei Aspekte sollten in der hier vorliegenden Doktorarbeit bearbeitet werden:

Erstens sollte das humane Zyxin charakterisiert und die Dynamik von Zyxin und Vinculin untersucht werden, um ihre Rolle in der zellulären F-Aktindynamik besser zu verstehen. Dieser Teil der Arbeit umfaßte zunächst die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Zyxin, um damit anschließend das Protein besser charakterisieren zu können.

Zweitens sollte nach weiteren zellulären Proteinen gesucht werden, die das Bindungsmotiv der EVH1-Domäne enthalten und damit, ähnlich wie ActA, an der Aktinpolymerisation beteiligt sein sollten.

Über die intensive biochemische und zellbiologische Charakterisierung dieser Proteine sollte versucht werden, die Regulation der zellulären Aktinpolymerisation und damit die Zellbewegung besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Reinheitsgrade "pro analysii" (p.a.) bzw. "reinst" der Firmen Amersham-Buchler, Applied Biosystems, Biorad, Boehringer Mannheim, Difco, Flow Laboratories, Fluka, Gibco BRL, Hoechst, Merck, Millipore, MoBiTec, New England Biolabs, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega, Qiagen, Riedel de Haën, Renner, Roth, Serva, Sigma und USB verwendet. Die Radiochemikalien wurden von Amersham bezogen. Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt. Medien und Pufferlösungen wurden autoklaviert (30 min., 121°C) oder sterilfiltriert (0,22 µm).

3.2 Bakterienkulturen

3.2.1 Verwendete Lösungen und Puffer:

- <u>LB-Medium:</u> "Luria-Bertani broth"	Bacto-Trypton	10	g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	120	mM
- <u>SOB-Medium:</u>	Bacto-Trypton	20	g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	10	mM
	KCl	2,5	mM
	MgCl ₂	10	mM
	MgSO ₄	10	mM

Die Magnesiumsalze werden separat autoklaviert und vor Gebrauch aus einer Stammlösung zugesetzt.

- Agarplatten:

Zur Herstellung von Agarplatten werden 16 g Bacto-Agar in 1 l Medium eingewogen und autoklaviert.

- Antibiotikazusätze:

Nach Abkühlen der autoklavierten Medien auf unter 45°C können Antibiotika-Stammlösungen dazugegeben werden.

Ampicillin	100	µg/ml
Kanamycin	25	µg/ml

3.2.2 Escherichia coli-Kulturen

Escherichia coli

TG 2: *supE hsd 5 thi (lac-proAB) (srl-recA)306::Tn10(tet^r)/F'(traD36 proAB⁺ lacI lacZ M15)*

BL21(DE3): *E.coli B, F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal (DE3)*

BL21(DE3)pLysE: *F⁻, omp T hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysE (Cm^R)*

BM25.8: *[F' traD36 lacI^q lacZΔM15 proA⁺ B⁺] supE thi Δ(lac-proAB) P1 Cm^R hsdR (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) (λimm⁴³⁴ Kan^R)*

3.2.3 Kulturbedingungen

Mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte werden 5 ml Kulturmedium mit entsprechender Antibiotikazugabe angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (G25, New Brunswick, USA) bei 37°C und 150 Upm kultiviert. Als Kulturgefäße verwendet man Reagenzgläser bzw. Erlenmeyerkolben ohne Schikane. Übernachtkulturen werden als 1000 bis 5000-fache Verdünnungen stationärer Vorkulturen angesetzt.

Für die kurzfristige Lagerung werden Stammkulturen auf Agarplatten mit entsprechender Antibiotikazugabe ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C maximal vier Wochen gelagert.

Die langfristige Lagerung erfolgt in Glycerinkulturen bei -70°C. Dazu wird eine Kultur in der Logphase (2 ml Medium, 6-8 h, 37°C) 0,75 ml entnommen und mit 0,25 ml sterilem Glycerin (87%) vermischt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Der überwiegende Teil der in dieser Arbeit verwendeten DNA Methoden entstammt den Protokollen nach Sambrook (Sambrook et al., 1989). Dort befinden sich auch sämtliche Literaturverweise zu den verwendeten Methoden. Im folgenden werden daher nur abweichende Literaturstellen zitiert.

3.3.1 Plasmide

pGEX-2TK	Pharmacia	GST-Fusionsproteine für bakterielle Expression
pGEX-6P1	Pharmacia	GST-Fusionsproteine für bakterielle Expression
pEGFP-N1	Clontech	GFP-Fusionsprotein für eukaryote Transfection
pMT7HE	Dirks et al., 1994	<i>in vitro</i> Translation
pEXlox	Novagen	Plasmid, das durch die P1 cre Rekombinase aus den λ Exlox Phagen entsteht.

3.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Verwendete Puffer und Enzyme:

Es werden die Restriktionsendonukleasen der Firma Boehringer, Gibco oder Biolabs mit den jeweils empfohlenen 10 x Puffern verwendet.

In einem Endvolumen von 15-100 μ l werden folgende Lösungen vermischt:

DNA		
10 x Restriktionspuffer	1	Unit
Restriktionsenzym	max. 1/10	Volumen
H ₂ O		

Der Ansatz wird für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und die Reaktion entweder durch die Zugabe von DNA-Stop-Puffer, durch Phenolisieren oder durch fünfminütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt.

3.3.3 Phenolisieren von DNA

Es wird die gebrauchsfertige Lösung Rotiphenol (Roth, Karlsruhe) verwendet.

Die wässrige DNA-Lösung wird mit dem gleichen Volumen Phenollösung versetzt und ca. 2 min stark geschüttelt. Durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 13000 x g wird eine Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Phase wird abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2 Volumen Ethanol vermischt und für 2 h bei -20 C ausgefällt. Durch Zentrifugieren bei 13000 x g wird die DNA in 15 min pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

3.3.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase

Um ein PCR-Fragment in einen Vektor zu klonieren, konzipiert man die Primer-Paare meistens so, daß die beiden entstehenden Enden unterschiedliche Restriktionsschnittstellen besitzen und diese auch in der richtigen Richtung im Vektor vorhanden sind.

Um eine Rückligation von eventuell. nur einfach-geschnittenen Vektormolekülen zu verhindern, wird der durch Restriktionsenzyme aufgeschnittene Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dieses Enzym spaltet die Phosphatgruppe an den 5'-Enden des Vektors ab. Somit ist ein Schließen des Vektors nur noch durch den Einbau eines Inserts möglich, welches die dazu nötigen Phosphatgruppen mitbringt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 10 x Dephosphorylierungspuffer:

Tris-HCl, pH 8,5	500	mM
EDTA	1	mM

In einem Endvolumen von 15-100 µl werden folgende Lösungen vermischt:

DNA		
10 x Dephosphorylierungspuffer	1/10	Volumen
alkalische Phosphatase	1	Unit
H ₂ O		

Der Ansatz wird zunächst für 30 min bei 37°C inkubiert, dann wird eine weitere Unit alkalische Phosphatase zugegeben und nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wird danach phenolisiert, in Ethanol gefällt und ein Aliquot im Agarosegel zur Mengenabschätzung aufgetrennt.

3.3.5 Einbau von Restriktionsschnittstellen in PCR-Primer

Um PCR-Fragmente zu klonieren, kann man verschiedene Methoden anwenden. In der vorliegenden Arbeit wurden schon bei der Konstruktion der Primer Restriktionsschnittstellen eingeplant, so daß eine Klonierung der Fragmente über "sticky ends" (klebrige Enden) möglich war. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die eingebaute Restriktionsschnittstelle mindestens 5 Nukleotide vom 5'-Ende des Primers entfernt liegt, da sie sonst, je nach Restriktionsenzym, nicht erkannt werden kann. Am 3'-Ende des Primers sollten mindestens die letzten 8 Nukleotide homolog sein, damit ein genügend großer Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase gewährleistet ist. Außerdem wurde versucht, eine Restriktionsschnittstelle durch möglichst wenige Basenaustausche zu konstruieren, um eine hohe Komplementarität beizubehalten. Die veränderten Hybridisierungsbedingungen von Primer und

Template müssen dabei berücksichtigt werden. Im Falle einer Klonierung in Vektoren, die für ein Fusionsprotein kodieren, ist außerdem auf die Einhaltung des Leserasters zu achten. Da dieses vom Vektor vorgegeben wird, müssen Restriktionsschnittstellen so im Primer lokalisiert werden, daß es nach der Ligation des Inserts in den Vektor an der Fusionsstelle zu einem rastergenauen Übergang des Triplettkodes kommt.

3.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(Referenzen siehe McPherson et al., 1991; 1995)

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion, nach dem englischen "**P**olymerase **C**hain **R**eaction" PCR genannt, beruht auf der mehrfachen, automatisierten Wiederholung eines Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension zweier zueinanderweisender Oligonukleotide, wobei ein definierter Abschnitt eines DNA-Moleküls logarithmisch amplifiziert wird. Erst durch die Entdeckung hitzestabiler DNA-Polymerasen, wie der Taq-DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus*, ist die Automatisierung dieses Vorgangs möglich geworden.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Es wurden die vom Hersteller (Takara, Boehringer Mannheim) mitgelieferten 10-fach PCR-Puffer benutzt.

DNA-"Template"

Die Herkunft der DNA kann unterschiedlich sein. Es wurde aufgereinigte Plasmid-DNA, revers transkribierte mRNA (siehe RT-PCR) oder eine ganze Bakterienkolonie als Template benutzt.

- Plasmid-DNA

In ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorff) werden

DNA in H ₂ O	1	µg
10-fach PCR-Puffer	10	µl
5'-Primer	200	nM
3'-Primer	200	nM
dNTP-Mix	200	µM
(dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer, Mannheim)		
Taq-DNA-Polymerase	2	Units

(Perkin Elmer bzw. MoBiTec)

mit H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 100 µl aufgefüllt. Um die Evaporation von Flüssigkeit zu vermeiden, wird der Ansatz mit 2 Tropfen leichtem Mineralöl (Sigma) überschichtet.

- Bakterienkolonie

Wenn eine Bakterienkolonie als "Template" verwendet werden soll, wird eine Kolonie von einer Agarplatte abgenommen und im Reaktionsgefäß in 50 µl H₂O suspendiert. Danach wird der Ansatz mit Mineralöl überschichtet und 5 min im PCR-Gerät auf 98 °C erhitzt. Erst dann werden die restlichen Komponenten zupipettiert.

PCR-Reaktion

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgt durch die Wiederholung eines bestimmten Zyklusprofils. Ein Zyklus, der zwar beliebig oft, in der Praxis aber nur 25-40 mal wiederholt wird, setzt sich im allgemeinen aus folgenden Teilschritten zusammen:

- | | |
|-------------------|---|
| 1. Denaturierung: | die DNA wird durch Erhitzen auf 96°C für 30 s denaturiert. |
| 2. Annealing: | je nach Schmelztemperatur der Primer wird die Temperatur auf 45-65°C gesenkt und für 60 s gehalten, damit die Primeroligos mit der Template-DNA hybridisieren können. |
| 3. Extension: | durch Inkubation des Ansatzes bei 72°C für 60-120 s (etwa 60 s pro 1000 Nukleotide) wird das gewünschte DNA-Fragment durch Verlängerung der Primer hergestellt. |

Nach Ablauf des PCR-Programmes werden 5 bzw. 10 µl des Ansatzes unter dem Öl abgezogen, mit 1/5 Volumen 5 x DNA-Stop-Puffer versetzt und der Erfolg der Reaktion auf einem 1%igen Agarosegel kontrolliert.

Wenn das PCR-Fragment kloniert werden soll, wird es mit dem Qiaquick spin Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.3.7 RT-PCR

Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wird mit dem Trizol® Reagenz der Firma GIBCO BRL durchgeführt. Dazu wird 1 ml Trizol® Reagenz auf eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 3,5 cm oder auf 5x10⁶ als Suspensionskultur wachsende tierische Zellen gegeben, durch Pipettieren lysiert und 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Danach wird 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol® Reagenz dazugegeben und 15 Sekunden lang stark mit der Hand geschüttelt. Um die Phasentrennung in eine untere rote Phenol-Chloroformphase und eine obere wäßrige Phase zu erreichen, wird bei 12000 x g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase, die die RNA enthält, wird abgenommen und die RNA mit Isopropanol (0,5 ml/ml Trizol®) präzipitiert. Nachdem die Probe 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wird das Präzipitat bei 12000 x g und 4°C 10 min abzentrifugiert, mit 75% Ethanol gewaschen (1 ml Ethanol/ml Trizol®, 7500 x g, 5 min, 4°C) und in Rnase-freiem Wasser (DEPC Wasser: 0,1% Diethylpyrocarbonat) aufgenommen.

Erststrang cDNA Synthese

Die Synthese des ersten Stranges der cDNA aus Gesamt-RNA wird mit dem "First strand cDNA synthesis kit" der Firma Pharmacia durchgeführt. Dazu wird 5 µg RNA mit DEPC Wasser (0,1% Diethylpyrocarbonat) auf 19 µl verdünnt und für 10 min. bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Für die Reaktion wird 11 µl First-strand-Mix, 1 µl Rnasin (Promega, 20 U/µl), 1 µl DTT (1M), 1 µl oligo dT Primer (0,2 µg/µl) und 19 µl RNA gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 90°C für 5 min. gestoppt.

3.3.8 Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Verwendete Lösungen und Puffer:

-1x TBE (~~Tris~~-Borsäure-EDTA):

Tris	45 mM
Borsäure	45 mM
EDTA	2 mM
pH 8,3	

-50 x TAE-Puffer (~~Tris~~-Azetat-EDTA):

Tris-Base	2 M
Na-Acetat	1 M
EDTA	50 mM

Der pH-Wert von 7,5 wird mit konzentrierter Essigsäure eingestellt.

-5 x DNA-Stop-Puffer:

50 x TAE-Puffer (s.o.)	20 µl
------------------------	-------

EDTA, pH 8,0	50	mM	
Ficoll	15	%	(v/v)
SDS	0,4	%	(w/v)
Xylenblau	0,05	%	(w/v)
Bromphenolblau	0,05	%	(w/v)

Größenstandards:

Als Standards für die Größe von DNA Fragmenten wurde für den Größenbereich von 100-1500 bp die "100 bp ladder" von Pharmacia und für größere DNA Fragmente die "1 kb ladder" der Firma Boehringer Mannheim verwendet.

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt mittels Elektrophorese in Agarosegelen. Durch Verwendung eines Eichstandards mit DNA-Fragmenten bekannter Größe ist es möglich, die Länge von linearisierten DNA-Fragmenten aus der entsprechenden Eichkurve zu bestimmen. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente variiert die Agarosekonzentration zwischen 0,5 % und 2 %. Die jeweilige Menge Agarose wird in 100 ml 1 x TAE-Puffer bzw. 1 x TBE-Puffer gelöst und im Mikrowellenherd aufgekocht. Wenn sie sich auf ca. 70°C abgekühlt hat, wird sie mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.1 µg/ml) versetzt und in eine Elektrophorese-Kammer (BRL, Model H5) mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wird der Kamm entfernt und das Gel mit 1 x TAE-Puffer bzw. 1 x TBE-Puffer überschichtet.

Elektrophorese

Die aufzutrennenden DNA-Proben werden mit 1/4 Volumen 5 x DNA-Stop-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100 Volt. Zur Abschätzung der Lauflänge dienen die beiden Farbstoffe im 5 x DNA-Stop-Puffer. Nach erfolgter Auftrennung kann das Gel unter UV-Licht betrachtet und photographiert werden.

3.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu isolierende Fragment wird nach der Elektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraktions Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wird zunächst das Gelstück in dem 3-fachen Volumen Puffer QX1 unter Schütteln im Thermoinkubator bei 50°C aufgelöst. Dann gibt man die Suspension auf eine Qiaquick-Spin-Säule und zentrifugiert bei 13000 x g für 1 min. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 0,75 ml Puffer PE durch

nochmaliges Zentrifugieren gewaschen. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt mit 50 µl H₂O in einem letzten Zentrifugationsschritt.

3.3.10 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Die Enden der DNA-Fragmente werden durch Restriktionsenzyme verdaut, so daß "sticky ends" entstehen. Nach einer Mengenabschätzung im Agarosegel werden sie dem dephosphorylierten Vektor im Überschuß zugegeben und in einem Volumen von 15 µl mit 10 x Ligationspuffer und 1 Unit T4-DNA-Ligase vermischt. Der Ligationsansatz wird bei 4 °C über Nacht inkubiert.

3.3.11 Transformation in *Escherichia coli*

Herstellung kompetenter Zellen

(Dagert & Ehrlich, 1979)

Eine Übernachtskultur von *E. coli* TG2 wird in 100 ml SOB-Medium 1:50 verdünnt, bei 37 °C geschüttelt und nach ca. 1-2 h in der logarithmischen Phase (OD₆₀₀ = 0,5) durch Zentrifugieren geerntet (5500 x g, 5-10 min). Das Pellet wird in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis gestellt. Nach einer weiteren Zentrifugation werden die Zellen in 1 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und für mindestens eine Stunde bei 0°C ruhen gelassen. Nun kann man sie entweder direkt zur Transformation verwenden, oder nach Zugabe von 10 % (v/v) sterilem Glycerin bei -70 °C lagern. Vor Gebrauch werden sie dann langsam auf Eis aufgetaut.

Transformation

Zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gibt man 0,1-1,0 µg Plasmid-DNA bzw. 7 µl Ligationsansatz und inkubiert für 10-15 min auf Eis. Danach folgt ein Inkubationsschritt von 5 min auf 37°C und dem eine Abkühlphase von 15 min auf Eis, wobei die Bakterien die DNA aufnehmen. Diese Prozedur wird wiederholt. Zur Erholung der Zellen gibt man nun 800 µl SOC-Medium hinzu und inkubiert sie 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken.

Danach wird die Kultur 1 min bei 13000 x g zentrifugiert, das Pellet in 200 µl SOC aufgenommen, auf Selektivmedium-Platten mit Antibiotika ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die daraus hervorgehenden Einzelkolonien werden in 2,5 ml Flüssigmedium kultiviert und die Plasmid-DNA für eine Schnellkontrolle präpariert.

3.3.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Verwendete Lösungen und Puffer:

- Lösung I:	Glukose	50	mM
	EDTA	10	mM
	Tris-HCl, pH 8,0	25	mM
- Lösung II:	NaOH	0,2	M
	SDS	1	% (w/v)
- Lösung III:	Ammoniumacetat	7,5	M

Plasmid-Minipräparation

Von 2,5 ml einer Übernachtskultur werden 1,5 ml abgenommen und abzentrifugiert (3 min., 2000 x g), aus den restlichen 1 ml können nach der Präparation bei gelungener Klonierung Klone auf Kulturplatten ausgestrichen werden. Das Zellpellet wird in 200 µl Lösung I aufgenommen und das Pellet gut resuspendiert und auf Eis gestellt. Danach pipettiert man 400 µl frisch hergestellte Lösung II zu, mischt vorsichtig und inkubiert den Ansatz zur vollständigen Lyse für 5 min auf Eis. SDS und NaOH lösen die Zellmembran auf und setzen den Zellinhalt frei. Um Zelltrümmer, Proteine, RNA und genomische DNA zu präzipitieren, werden 300 µl Lösung III zugegeben und vermischt. Nach 10 min auf Eis wird für 10 min abzentrifugiert (13000 x g) und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die in der wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wird mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und dann pelletiert. Nachdem die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen wurde, wird sie 5 min. bei 37°C getrocknet und in 100 µl H₂O bzw. 10 mM Tris-HCl pH 8,5 mit 10 µg/ml Rnase aufgenommen. 10 µl davon werden für einen Restriktionsverdau benötigt und zur Kontrolle in einem 1 %- Agarosegel aufgetrennt.

Plasmid-Maxipräparation

Hierfür werden die Produkte und Puffer der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Prozedur wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

Mit einem Inoculum von 100 µl einer Übernachtskultur werden 400 ml TB-Medium angeimpft und nach Antibiotika-Zugabe 6-8 h bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wird 5 min bei 8000 x g abzentrifugiert, die Zellen in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 10 ml Puffer P2 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT werden 10 ml eiskalter Puffer P3 hinzugefügt, gut gemischt und der Ansatz 20 min

auf Eis gekühlt. Anschließend zentrifugiert man 30 min bei mind. 30.000 x g, um Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA zu pelletieren. Ab diesem Schritt arbeitet man nur noch bei RT, um möglichst wenig Salze mitzuführen. Der DNA-haltige Überstand wird abgenommen, das Pellet nochmal zentrifugiert und die beiden Überstände vereinigt.

Eine Qiagen-tip 500 Säule wird mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert und dann mit den Überständen beladen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 30 ml Puffer QC kann die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert werden, wobei das Eluat zum Präzipitieren direkt in 11 ml Isopropanol tropft. Die DNA wird abzentrifugiert, das Pellet mit 70 %- Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 500 µl H₂O bzw. 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen.

3.3.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten

Für die Sequenzierung wird das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Modell 377) verwendet. Hiermit ist es möglich, durch Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Fragmente während eines Polyacrylamidgellaufes automatisch zu erfassen. Dafür ist die Verwendung einer "On-Line"-Detektion und der Einsatz eines Lasers erforderlich. Dieser wird zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe benötigt. Die Markierung der DNA erfolgt dabei am 3'-Ende durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden als Terminatoren.

Die Methode der Taq-Cycle-Sequenzierung mit dem automatischen Sequenzer von ABI beruht auf folgendem Prinzip:

Als "Template" dient möglichst saubere, dialysierte Plasmid- oder PCR-DNA. Über ein Thermocycler-Amplifikations-Profil, ähnlich dem einer PCR-Reaktion, entstehen mit Hilfe der Taq-Polymerase DNA-Fragmente, die hierbei allerdings nur von einem Primer ausgehen. Es findet also keine Potenzierung der Fragmentanzahl statt, sondern pro Zyklus maximal eine Erhöhung um die Zahl der Templatemoleküle. Zusätzlich zu den für die normale Kettenverlängerung benötigten Deoxynukleotiden sind in weitaus geringerer Konzentration Dideoxynukleotide im Ansatz vorhanden, denen die 3'-OH-Gruppe fehlt. Diese führen an unterschiedlichen Stellen, je nach Zeitpunkt des Einbaues, zu einem Kettenabbruch. Dadurch entsteht ein Gemisch von DNA-Fragmenten, deren Länge zufällig verteilt ist. Jedes dieser Dideoxynukleotide ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Alle Fragmente, die durch das gleiche Nukleotid gestoppt werden, tragen somit den gleichen Farbstoff. Wird jetzt dieses Fragmentgemisch elektrophoretisch aufgetrennt, ergibt sich eine bunte Bandenleiter, bei der jede Bande mit ihrer Farbe für ein Nukleotid in der Sequenz der Template-DNA steht.

Die On-Line Detektion ermöglicht es, daß die Banden aus dem Gel herauslaufen. Kurz vor Verlassen des Geles werden sie durch eine Laser-Abtastung registriert und in einem Computer zur späteren Auswertung abgespeichert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Es wird der "Taq Dye-Deoxy Terminator Cycle Sequenzierungskit" von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet, der sämtliche Lösungen für den Premix und die Taq-Polymerase enthält.

Reaktionsansatz:

Premix		4,0	µl
DNA-Template		1,0	µg
Primer		3,3	pmol
H ₂ O	ad	20	µl

Mit je 2 Tropfen leichtem Mineralöl wird der Ansatz überschichtet (nur im Landgraf Thermocycler).

Thermocycler Programm:

Es werden 25 Zyklen gefahren.

a)	Denaturierung	96	C	15	Sekunden
b)	Hybridisierung	50-55	C	15	Sekunden
c)	Kettenverlängerung	62	C	4	Minuten

Probenaufbereitung:

Bevor die Ansätze auf das Gel aufgetragen werden, müssen überschüssige Primer, nicht eingebaute Nukleotide und "Dye"-Terminatoren entfernt werden. Wenn die Proben nicht gleich nach dem "Thermocycling"-Profil weiterverarbeitet werden können, sind sie für 1-2 Tage bei 4°C lagerfähig. Es muß darauf geachtet werden, daß sie dunkel stehen, da sonst die Fluoreszenzfarbstoffe zerfallen.

Der Reaktionsansatz wird unter dem Mineralöl abgezogen und in 50 µl 100 % Ethanol pipettiert. Nach Zugabe von 2 µl 3 M NaAc, pH 5,2, wird die DNA gefällt und mit 13000 x g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Ethanol entfernt und die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. In diesem Zustand kann die Probe auch längere Zeit eingefroren gelagert werden. Vor dem Auftragen auf das Gel nimmt man das trockene DNA-Pellet in 3 µl Formamid/EDTA auf, erhitzt es für 2 min auf 90°C und kühlt es auf Eis ab.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Verwendete Lösungen und Puffer:

-30 % Acrylamid-Lösung:

Acrylamid (BIO-RAD)	29	g/100 ml
Bisacrylamid (BIO-RAD)	1	g/100 ml

-10 x TBE-Puffer:

Tris Base	900	mM
Borsäure	890	mM
EDTA	28	mM

Die Elektrophorese erfolgt in einem 0,2 mm dicken, 4 % Polyacrylamidgel, das zwischen zwei 25 x 42 cm großen, fluoreszenzfreien und planaren Glasplatten gegossen wird. Beide Glasplatten werden nach Vorschrift des Herstellers gesäubert und zusammengesetzt. Für das Gel werden

Harnstoff	17,5	g
30 % Acrylamid-Lösung	5,6	ml
10 x TBE-Puffer	5,0	ml
H ₂ O	17,8	ml

vermischt, durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und 5 min entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von

10 % APS-Lösung (w/v) (Ammoniumpersulfat)	292	µl
TEMED	12,5	µl

gestartet und das Gel anschließend sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach 2-stündiger Polymerisation in horizontaler Lage kann das Gel in den Sequenzer eingespannt werden.

3.3.14 Screening einer Expressions-Bibliothek

Verwendete Lösungen, Puffer und Agarplatten:

- 2 x YT Agarplatten:	Bacto Trypton	16 g/l
	Hefe Extrakt	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	15 g/l
	Autoklavieren	
- Top Agarose:	Bacto Trypton	10 g/l
	Hefe Extrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	6 g/l
	Autoklavieren	
- SM-Puffer:	5 M NaCl	20 ml/l
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2 g/l
	1 M Tris-HCl pH7.5	50 ml/l
	Gelatine	100 mg/l
	Autoklavieren	

Screening Prozedur

(für Phagen-Bibliotheken, die mit dem λEXlox Vektor hergestellt wurden (Novagen):

1. Runde (für 2.-4. Runde)

1.) Von einer Einzelkolonie wird eine 50 ml o/n-Kultur von BL21(DE3)pLysE in LB, 0,2% Maltose, 10 mM MgSO₄, 34 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und bei 37°C inkubiert.

2.) 5 x 10⁴ pfu (2 x 10⁴ pfu)("plaque forming units") in 100 µl SM-Puffer werden mit 600 µl (200 µl) Bakteriensuspension gemischt und bei 37°C für 30 min inkubiert, damit die Phagen an ihre Wirtszellen adherieren können.

3.) Dann wird 8 ml (3 ml) auf genau 50°C abgekühlte, geschmolzene Top-Agarose dazugegeben, gemischt, schnell auf eine 150 mm (82 mm) 2 x YT Agarplatte gegossen und gleichmäßig verteilt. Die Platten werden umgedreht bei 37°C für ca. 7 Stunden inkubiert, bis die Plaques eine Größe von ungefähr 0,5-1 mm haben.

4.) Nun werden trockene Nitrozellulosefilter vorsichtig auf die Agarplatten gelegt, weitere 3,5 Stunden umgedreht bei 37°C inkubiert und danach wenigstens 1 Stunde bei 4°C gekühlt.

5.) Die Filter und Platten werden nun asymmetrisch mit einer Kanüle und schwarzer, wasserfester Tinte markiert. Nachdem die Filter vorsichtig von den Platten abgehoben wurden, können sie nun wie ein normaler Western Blot behandelt werden.

6.) Im Western Blot positive Plaques werden erneut getestet, indem das korrespondierende Gelstück mit einer Pasteurpipette ausgestochen und o/n bei 4°C in 1 ml SM-Puffer gelöst wurde (Runde 2-4). Dies erfolgt so oft, bis alle Plaques auf einer Platte im Western Blot ein positives Signal zeigen.

Titern einer Phagen-Bibliothek:

Vor der ersten Benutzung einer neuen Phagen-Bibliothek muß ihr Titer bestimmt werden. Dazu wird eine Reihenverdünnung in SM-Puffer angesetzt, die Schritte 1-3 der Screening Prozedur durchgeführt und die Plaques auf Platten mit verschiedenen Verdünnungen ausgezählt.

"Autosubcloning":

Für die meisten folgenden Schritte, wie Sequenzieren, Klonieren, etc. ist es von Vorteil, wenn die DNA als Plasmid vorliegt. Mit früher gebräuchlichen Systemen (λ gt11) mußte dazu das entsprechende DNA Fragment herausgeschnitten werden und auf herkömmlichen Weg in ein Plasmid kloniert werden. Im benutzten System (λ EXlox Vektor, Novagen) können jetzt dagegen die isolierten, gereinigten Phagen sehr einfach in Plasmide Überführt werden, da die Phagen-DNA ein komplettes Plasmid enthält, das von zwei *loxP* Erkennungsstellen flankiert ist. Wenn diese Phagen eine Bakterienzelle infizieren, die die P1 cre Rekombinase exprimiert (*E. coli* BM25.8), wird das Plasmid durch die Rekombinase an den *loxP* Erkennungsstellen herausgeschnitten und zu einem vollständigen Plasmid ligiert. Unter Antibiotika-Selektion enthalten dann alle Kolonien das entstandene Plasmid.

Dazu wird eine o/n Kultur des *E. coli* Stamms BM25.8 mit einer entsprechenden Verdünnung der isolierten, gereinigten Phagen gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert, damit die Phagen an ihre Wirtszellen adherieren können. Diese Mischung wird direkt auf eine LB-Agarplatte (mit 50 µg/ml Carbenicillin) verteilt und bei 37°C o/n inkubiert.

3.4 Peptid Methoden

Die Herstellung der Peptide und die Spot-Synthese von immobilisierten Peptiden wurde dankenswerter Weise von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. R. Frank (GBF) durchgeführt

3.4.1 Synthese freier Peptide

Für die Synthese freier Peptide werden kleine, mit "TentaGel S" Harz (Rapp Polymere, Tübingen) gefüllte Säulen benutzt. Pro Säule können 50 - 60 mg Peptid hergestellt und nach Abschluß der Synthese vom Harz abgespalten und lyophilisiert werden

3.4.2 Spot-Synthese von immobilisierten Peptiden

Die Spot Synthese erfolgt, im Prinzip wie von R. Frank (1992) beschrieben, mit einem ABIMED-Gerät (AMS 422 Multiple Peptide Synthesizer, Model 222 sample Changer, Dilutor 401) auf vorbehandeltem Whatman 3 MM-Papier. Das Papier wird derivatisiert, indem β -Alanin- β -Alanin als Anker und Abstandhalter kovalent an die Hydroxylgruppen der Cellulose gebunden werden. An den freien Aminogruppen der Alanine erfolgt die Kopplung weiterer Aminosäuren in der gewünschten Reihenfolge. Von den verschiedenen Aminosäurederivaten werden 0,3 M Lösungen in NMP (1-Methyl-3-Pyrrolidin) angesetzt und aliquotiert. Das "Aufspotten" der verschiedenen Aminosäuren auf die jeweiligen Positionen auf dem Papier erfolgt automatisch mit einem Roboterarm. Bevor der nächste Synthesesyklus begonnen werden kann, müssen die freien Aminogruppen, die nicht reagiert haben, durch Behandlung mit 2% (v/v) Essigsäureanhydrid in DMF (N,N-Dimethylformamid) acetyliert werden. An diese Gruppen können dadurch keine weiteren Aminosäuren gekoppelt werden, was zur Folge hat, daß diese Peptide verkürzt sind. Aber so wird verhindert, daß Peptide mit falschen Sequenzen auftreten.

Bevor der nächste Syntheseschritt begonnen wird, muß die Schutzgruppe an der Aminogruppe des zuletzt gebundenen Aminosäurederivates abgespalten werden. Dazu wird das Whatman Papier 5 min mit 10% (v/v) Piperidin in DMF inkubiert. Durch anschließendes Anfärben mit 1% (v/v) Bromphenolblau in DMF werden freie Aminogruppen sichtbar gemacht und so kontrolliert, ob das Entschützen erfolgreich war. Wenn die Peptide die gewünschte Länge erreicht haben, werden die terminalen Aminogruppen acetyliert ("Endcapping") und die Seitenschutzgruppen, die die Ausbildung von Kettenverzweigungen während der Synthese verhindern, abgespalten. Die Abspaltung dieser Gruppen erfolgt durch Inkubation des Papiers mit einer Lösung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1:1), die mit 3% (v/v) TIBS (Trisobutylsilan) und 2% (v/v) H_2O_2 versetzt war. Nach anschließendem Waschen mit CH_2Cl_2 , DMF und Ethanol ist der Peptid-Scan gebrauchsfertig.

3.5 Protein Methoden

Protein-Größenmarker für die SDS-Gelelektrophorese

- "10 kDa ladder " (von Gibco BRL)
- "Low molecular weight marker" (von Biorad): 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,5 kDa

Verwendete Lösungen und Puffer:

- PBS:	KCl	26,5	mM
	NaCl	137,0	mM
	KH ₂ PO ₄	1,5	mM
	NaH ₂ PO ₄	8,0	mM
	pH 7,5		

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli, 1970)

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Acrylamidstammlösung:	Acrylamid	30	%	(w/v)
	N,N-Methylenbisacrylamid	0,8	%	(w/v)

Hierfür wird die fertige Lösung Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe) verwendet.

- 4x Probenpuffer:	4	ml	10 % (w/v)	SDS-Lösung
	0,6	ml	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	2,3	ml		H ₂ O
	4	ml		Glyzerin
	0,4	ml		2-Mercaptoethanol
	0,2	ml	5 % (w/v)	Bromphenolblau

- Trenngel	7,5%	10,0%	15,0%	
	3,0	2,44	1,44	ml H ₂ O

1,5	1,52	1,52	ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
1,5	2	3	ml	Acrylamidstammlösung
60	60	60	µl	10 % (w/v) SDS-Lösung
8	8	8	µl	TEMED

Die Polymerisation wird mit 12 µl 25% (w/v) Ammoniumpersulfatlösung gestartet.

- Sammelgel (5%):	1,8	ml		H ₂ O
	320	µl	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	330	µl		Acrylamidlösung
	25	µl	10 % (w/v)	SDS-Lösung
	6	µl		TEMED

Die Polymerisation wird mit 10 µl 25% (w/v) Ammoniumpersulfatlösung gestartet.

Für die Durchführung werden Minigelapparaturen (Biometra) der Größe 8,5 x 7,0 cm und 1 mm Stärke verwendet. Die Gele werden zum Polymerisieren vor dem Gellauf mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

- Laufpuffer:	Tris-Base	25	mM
	Glycin	192	mM
	SDS	0,1	% (w/v)

Durchführung der Gelelektrophorese

Alle Proben werden kurz vor dem Auftragen für 5 Minuten auf 95 C erhitzt.

Gellauf:

Pro angeschlossenem Gel wird die Stromspannung auf

120 V, max. 15 mA (Sammelgel)

180 V, max. 20 mA (Trenngel)

konstant gehalten.

Nach einer Elektrophoresezeit von etwa zwei Stunden werden die Gele entweder zur Western Blot Analyse verwendet, oder einer Coomassie-Färbung unterzogen, anschließend in einer Geltrockner Apparatur getrocknet.

3.5.2 Coomassie-Färbung

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Coomassie-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R250	0,25	% (w/v)
	(Serva)		
	Isopropanol	45	% (v/v)
	Essigsäure	9	% (v/v)
	H ₂ O	46	% (v/v)
- Coomassie-Entfärber:	Essigsäure	10	% (v/v)
	Methanol	40	% (v/v)
	H ₂ O	50	% (v/v)

Zur Anfärbung von Protein-Banden wird das SDS-Gel 15-30 min in der Färbelösung auf einem Schwenktisch bei RT inkubiert. Anschließend wird es entfärbt, bis die Banden deutlich kontrastiert erkennbar sind. Das Gel kann nun photographiert, gescannt und auf einer Gel-Trockner Apparatur getrocknet werden.

3.5.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wird mit einem "Silver Stain Plus Kit" (Biorad) in gründlich gereinigten Glasschalen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wird abgestoppt, indem das Gel in 5 % (v/v) Essigsäure überführt wird. Anschließend wird das Gel ggf. photographiert und getrocknet.

3.5.4 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wird das jeweilige Genkonstrukt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektor pGEX-2TK bzw. pGEX-6P1 der Firma Pharmacia kloniert. Dieser Vektor bietet die Möglichkeit, das gewünschte Polypeptid in Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase von *E. coli* exprimieren zu lassen. Der Vorteil besteht in einer einfachen Aufschluß- und Reinigungsmethode. Glutathion-S-Transferase bindet sehr stark an sein Substrat Glutathion. Das Fusionsprotein läßt sich somit spezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix binden und anschließend mit freiem Glutathion eluieren.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Diese Lösung wird sterilfiltriert.

Elution des GST-Fusionsproteins:

Spaltung des GST-Fusionsproteins:

52

Radioaktive Markierung von GST-Fusionsproteinen:

Die GST-Fusionsproteine, die mit dem Vektor pGEX-2TK (Pharmacia) hergestellt wurden, können leicht radioaktiv markiert werden, da zwischen der Glutathion-S-Transferase und dem Fusionsprotein sich eine spezifische Phosphorylierungsstelle für eine Kinase aus dem Rinderherz befindet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 10 x HMK ("Heart Muscle Kinase") Puffer:	Tris	200 mM
	NaCl	1 M
	MgCl ₂	120 mM
		pH 7.5

- Bovine Heart Kinase Lösung:

Bovine Heart Kinase, lyophilisiert (Sigma P2645)	10 U/μl
Dithiothreitol	40 mM

- [γ-³²P]-ATP. 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham

- Protein-Kinase-Reaktions Mix:

10 x HMK-Puffer	15 μl
Bovine Heart Kinase Lösung	5 μl
[γ- ³² P]-ATP	5 μl
H ₂ O	125 μl

- Stop Lösung:

Natriumphosphat	10 mM
Natriumpyrophosphat	10 mM
EDTA	10 mM
BSA	1 mg/ml
	pH 8.0

Dazu wird die Glutathion-Sepharose mit dem GST-Fusionsprotein mit 1 x HMK Puffer gewaschen, mit 300 μl Protein-Kinase-Reaktions Mix pro ml Bettvolumen gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Dann wird 10 ml Stop-Lösung pro ml Bettvolumen hinzugefügt, die Sepharose abzentrifugiert und der

Überstand restlos entfernt. Nach intensivem Waschen mit PBS kann das radioaktiv markierte Fusionsprotein abgespalten oder eluiert werden.

3.5.5 *In vitro* Transkription und Translation

Verwendete Reagenzien

- TnT[®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)
- Ribonuclease Inhibitor (RNasin[®], Promega)
- ³⁵S-Methionin (1000 Ci/mmol in 10 mCi/ml, Amersham)

Der TnT[®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate Kit bietet die Möglichkeit, in einem Schritt Plasmid-DNA zu transkribieren und die daraus resultierende mRNA zu translatieren. Dies ist durch den kombinierten Einsatz von T7-RNA-Polymerase und aller zur Translation erforderlichen Proteine, Aminosäuren und Zellbestandteile möglich, die in einem Lysat aus Kaninchenretikulozyten enthalten sind. Die Proteinkodierende DNA-Sequenz wird in einen Vektor kloniert, der sie unter die Kontrolle eines prokaryontischen Promotors stellt. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür Konstrukte im pMT7HE Vektor (Dirks et al., 1994) verwendet, die über Plasmid-Präparationssäulen gereinigt wurden. Mit Hilfe der prokaryontischen Polymerase wird *in vitro* mRNA hergestellt und diese simultan im Retikulozyten-Extrakt translatiert. Wird das zum Einbau zur Verfügung gestellte Methionin gegen ³⁵S-Methionin ausgetauscht, werden alle neu synthetisierten Proteine radioaktiv markiert.

Die Verwendung des kombinierten Transkription- und Translations-Kits macht eine separate Herstellung von mRNA überflüssig. Im Gegensatz zur Transkription, die durch prokaryontische mRNA-Polymerasen, wie z.B. T7 oder SP6, kontrolliert wird, läuft die Translation mit Hilfe des eukaryontischen Syntheseapparates ab.

Reaktionsansatz:

- | | | |
|--|----|----|
| - TnT [®] Kaninchen Retikulozyten Lysat | 25 | µl |
| - TnT [®] Reaktions Puffer | 2 | µl |

- TnT [®] T7 RNA Polymerase	1	μl
- TnT [®] Aminosäure Mix ohne Methionin (1 mM)	1	μl
- RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor (40 Units/μl)	1	μl
- ³⁵ S-Methionin (1000 Ci/mmol in 10 mCi/ml)	4	μl
- Plasmid-DNA	1	μg

Der Ansatz wird mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 μl gebracht. Kleinere Mengen von Protein werden durch proportionale Reduktion der Reagenzienmengen erreicht. Der Reaktionsansatz wird für 2 h im 30°C Heizblock inkubiert und kann dann direkt weiterverwendet oder bei -70°C eingefroren werden.

3.5.6 Protein-Bindungsassays

Durch die Inkubation eines Western Blot (Blot-Overlay Assay) mit einem radioaktiv-markierten Protein können bestimmte Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden, die keine intakte Faltung des auf der Blotmembran immobilisierten Bindungspartners voraussetzen.

Dazu werden Proteine oder Zellextrakte elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (siehe **3.6.2 Western Blot**) und unspezifische Bindungsstellen mit 10% FCS in TBS-T abgesättigt. Das durch *in vitro* Translation mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markierte Protein wird in 10% FCS in TBS-T aufgenommen. Damit wird dann die auf der Membran 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, viermal 15 min mit TBS-T gewaschen und dann in Saranfolie verpackt. Gebundene Proteine werden durch Autoradiographie mit einem Phosphorimager[®] nachgewiesen.

3.5.7 Bindungstest an immobilisierten Peptiden (Peptid-Scans)

Epitop-Kartierung von monoklonalen Antikörpern:

Die Behandlung des Peptid-Scans entspricht im Prinzip der Behandlung eines Western Blots. Der Peptid-Scan wird über Nacht mit 10 % (v/v) FCS in TBS-T abgesättigt, zunächst als Negativkontrolle nur mit dem Sekundärantikörper getestet und anschließend die entsprechenden mAk. Für die Detektion wird das Chemolumineszenz-Substrat (ECL-Kit, Amersham) verwendet, um eine Farbreaktion auf dem Papier zu vermeiden.

Bestimmung von Proteinbindungsstellen mit radioaktiv markierten Proteinen:

Durch die Inkubation eines Peptid-Scans mit einem radioaktiv markiertem Protein können bestimmte Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden, wenn die Bindung in einem der beiden Proteine

an eine kurze, lineare Peptidsequenz erfolgt. Die Aminosäuresequenz dieses Proteins muß dann als Peptidscan synthetisiert werden.

Der über Nacht abgesättigte Peptid-Scan wird dazu 2 Stunden bei Raumtemperatur mit radioaktiv markiertem Protein in 10% FCS (v/v) in TBS-T auf einem Wipptisch inkubiert, viermal 15 min mit TBS-T gewaschen und dann in Saranfolie verpackt. Gebundene Proteine werden durch Autoradiographie mit einem Phosphorimager® nachgewiesen.

Ein Peptidscan kann mehrfach verwendet werden, da Proteine und Antikörper sich durch eine stringente Waschprozedur ablösen lassen.

Jeder Waschschrift wird 10 min ausgeführt:

3 x H₂O

3 x 8 M Harnstoff, 1% SDS, 0,5% β-Mercaptoethanol (1 x im Ultraschallbad)

3 x 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol, 40% (v/v) H₂O

3 x Ethanol

Danach kann der Peptid-Scan getrocknet und bei -20°C gelagert werden.

3.6 Immunologische Methoden

Primärantikörper

Die jeweiligen verwendeten Primärantikörper wurden hergestellt bzw. bezogen von:

anti c-Abl	(mAk)	Pharmingen	8E9	#14101A
anti α-Aktinin	(mAk)	Sigma	BM-75.2	# A5044
anti CD3	(mAk)	Dr.S. Weiß, GBF	TR66	
anti Dynamin	(mAk)	Transduction Labs	# D25520	
anti Evl	(mAk)	GBF, Braunschweig	84H1	
anti Evl	(Antiserum)	Dr.Frank Gertler, MIT, Cambridge, MA, USA		
anti Fyb/SLAP	(pAk)	in dieser Arbeit	#51	
anti Fyb/SLAP	(pAk)	in dieser Arbeit	#81	
anti Mena	(Antiserum)	Dr.Frank Gertler, MIT, Cambridge, MA, USA		
anti Phosphotyrosin	(mAk)	Upstate Biotechnology	4G10	
anti PI(3)K	(mAk)	Transduction Labs	# P13020	
anti VASP	(mAk)	GBF, Braunschweig	60D4, IE273D4, IE226C2	
anti Vav	(mAk)	Dr.Frank Gertler, MIT, Cambridge, MA, USA		
anti Vinculin	(mAk)	Sigma	hVin-1	

anti WASP	(Antiserum)	Dr.Jonathan Derry, Immunex Corp. USA	Fus3
anti Zyxin	(mAk)	in dieser Arbeit	164D4
anti Zyxin	(mAk)	in dieser Arbeit	184A3

Sekundärantikörper (von Dianova, Hamburg)

- Cy-2 konjugierter Ziege anti Kaninchen IgG (H+L), 1,5 mg/ml
- Cy-3 konjugierter Ziege anti Kaninchen IgG (H+L), 1,5 mg/ml
- Rhodamin-konjugierter Ziege anti Kaninchen IgG (H+L), 1,5 mg/ml.
- Cy2- konjugierter Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L), 1 mg/ml
- Cy3- konjugierter Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L), 1 mg/ml
- Rhodamin- konjugierter Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L), 1 mg/ml
- Peroxidase-konjugierter Ziege anti Kaninchen IgG (H+L), 1 mg/ml, präabsorbiert gegen Humanserumproteine.
- Peroxidase-konjugierter Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L), 1 mg/ml, präabsorbiert gegen Human-, Rind- und Pferdeserumproteine.

Reagenzien für die Fluoreszenzmikroskopie

- Rhodamin- bzw. Fluoreszein-konjugiertes Phalloidin (bindet an F-Aktin) (Sigma, Deisenhofen)
- Cy3-konjugiertes Phalloidin

3.6.1 ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay")

Entwicklungsreagenz für eine Mikrotiterplatte:

6,25 ml 0,1 M Citrat
6,25 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄
12,5 ml H ₂ O
10 mg o-Phenylendiamin
12,5 µl 30 % H ₂ O ₂

Für den ELISA werden "Maxisorp"-Mikrotiterplatten (Nunc) verwendet; es werden grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Beschichtung der Platten wird das Antigen in 0,1 M Carbonatpuffer (NaHCO₃), pH 9,6 auf eine geeignete Konzentration verdünnt, 50 µl/"Well" aufgegeben und 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Platte mit 10 % (v/v) FCS in PBS mindestens 2 h bei 37°C abgesättigt (200 µl/"Well"). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (Columbus "Stripwasher", SLT-Tecan, Crailshaim) wird der 1. Antikörper (Hybridomüberstand oder bei gereinigten Antikörpern in Blockierlösung verdünnt) aufgegeben (100 µl/"Well") und 1 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wird PBS aufgetragen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt,

nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS, mit Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Maus bzw. bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern (Dianova). Diese werden 1:2000 in Blockierlösung verdünnt eingesetzt und ebenfalls 1 h inkubiert. Nach diesem Schritt wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Sekundärantikörper mit der daran gebundenen Peroxidase quantitativ zu entfernen. Die Färbelösung mit H_2O_2 und o-Phenylendiamin als Substrat muß jeweils frisch angesetzt werden, da es instabil ist. Es werden pro "Well" 200 μl Entwicklungsreagenz zugegeben und die Färbereaktion durch Zugabe von 50 μl /"Well" 0,2 M H_2SO_4 abgestoppt. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der OD_{490} (Referenz OD_{560}) auf einem Mikrotiterplatten Lesegerät (Spectra Max 250, MWG-Biotech, Göttingen).

Subklassentest

Die Immunglobulinsubklassen der einzelnen monoklonalen Antikörper werden mit einem "Sandwich"-ELISA bestimmt. Die ELISA-Platte wird mit einem Ziege-anti-Maus monoklonalem Antikörper wie oben beschrieben beschichtet, abgesättigt und die Überstände der verschiedenen Klone in je 12 "Wells" pipettiert. Nach dem Waschen wurden fünf verschiedene Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Medac) verwendet, die jeweils spezifisch für eine bestimmte Subklasse von Mausimmunglobulinen sind. Es werden je zwei "Wells" mit Antikörpern gegen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und als Positivkontrolle ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus monoklonaler Antikörper (Dianova) aufgegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit und anschließendem Waschen wird wie oben beschrieben entwickelt.

3.6.2 Western Blot

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Blotpuffer:	Tris-Base	50	mM
	Glycin	39	mM
	SDS	1,3	mM
	Methanol	20	% (v/v)
- Ponceau-Färbelösung:	Ponceau S (Sigma)	0,25	% (w/v)
	Methanol	40	% (v/v)
	Essigsäure	15	% (v/v)
	H_2O	45	% (v/v)

Transfer auf Trägermembran

Zum Transfer der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Trägermembran (Poly-Vinylidene-Di-Fluorid, Immobilon P, Millipore) wird ein "semi-dry"-Verfahren angewendet. Die Gele werden nach dem Lauf kurz in Blotpuffer äquilibriert, ebenso wie die Immobilon-Membran, die vorher durch Methanol aktiviert wird. Danach werden auf die mit Blotpuffer befeuchtete Anoden-Graphitplatte

2 Lagen Filterpapier (Whatman, in Blotpuffer getränkt),
Immobilon-P-Membran,
SDS-Gel,
2 Lagen Filterpapier

luftblasenfrei geschichtet.

Die Transferzeit beträgt 1 h bei 120 mA ein Gel, bzw. 160 mA bei zwei Gelen.

Als Kontrolle für einen erfolgreichen Transfer können die Proteine auf der Membran reversibel mit Ponceau-Färbelösung behandelt werden. Hierzu taucht man die Membran einige Sekunden in die Ponceau-Lösung und wäscht die nicht an die Proteine gebundenen Farbstoffe mit Wasser aus. Anschließend wird die Membran vollständig mit Wasser entfärbt.

3.6.3 Immunfärbung und Chemolumineszenz

Verwendete Puffer und Lösungen:

- TBS-T:	Tris-HCl, pH 7,6	20	mM
	NaCl	137	mM
	Tween 20	0,1	% (v/v)
- Absättigungspuffer:	FCS in TBS-T	10	% (v/v)

Absättigung

Nach einmaligem Waschen der Membran in TBS-T wird sie zum Absättigen aller unspezifischen Bindungsstellen auf der Trägeroberfläche über Nacht bei 4 C in Absättigungspuffer inkubiert.

Inkubation mit Antikörpern

Je nach Ursprung des verwendeten Antikörpers werden monoklonale Antikörper als unverdünnter Hybridom-Kulturüberstand, polyklonale und Peroxydase-konjugierte Antikörper in einer bis zu 1000fachen Verdünnung in Absättigungspuffer eingesetzt. Die Inkubationszeit beträgt jeweils 1 h bei RT auf einem Schwenktisch. Nach jedem Inkubationsschritt werden die Membranen für je 10 min mit

1. TBS-T
2. TBS-T + 0,5 M NaCl
3. TBS-T + 0,5 % (v/v) Triton-X-100

gewaschen.

Chemolumineszenz

Die Chemolumineszenz stellt ein hochempfindliches Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen dar. Sie basiert darauf, daß die Peroxidaseaktivität, die an die Sekundärantikörper gekoppelt ist, in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol oxidiert. Dabei wird Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichtet.

Das ECL-Substrat (Enhanced-Chemo-Luminescence, Amersham-Buchler) wird den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die gewaschene Membran wird für ca. 1 min bei RT mit der proteintragenden Seite nach oben mit ECL-Substrat benetzt. Anschließend läßt man das Substrat vorsichtig auf Filterpapier ablaufen und legt die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Overhead-Projektor Folien. Auf der so eingeschlagenen Membran wird für wenige Sekunden bis zu 15 Minuten ein Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak) durch Auflegen exponiert. Dieser wird in einer automatischen Entwicklungsmaschine (Agfa Curix 50) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

Chlornaphtolfärbung:

Das Entwicklungssubstrat wird jeweils frisch aus den Komponenten hergestellt, da es instabil ist:

- 25 ml PBS
- 1,5 ml 0,3 % (w/v) 4-Chlornaphtol in Methanol
- 20 µl 30% H_2O_2

Die Reaktion wird durch Spülen mit Wasser gestoppt. Da die Färbung lichtempfindlich ist und schnell ausbleicht, sollte der Blot bald photographiert werden.

3.6.4 Immunfluoreszenz

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Moviol-Einbettungsmittel:	Moviol 4-88 (Hoechst, Frankfurt)	2,4	g
	Glyzerin	6	g
	H ₂ O	6	ml

Die Zutaten werden gemischt und 2 h bei RT stehengelassen. Danach fügt man

0,2 M Tris-HCl, pH 8,5	12	ml
------------------------	----	----

hinzu. Die Lösung wird für 10 min bei 50 C inkubiert, 15 min bei 5000 x g abzentrifugiert und nach Zusatz von

NaN ₃	0,02	%	(w/v)
------------------	------	---	-------

bei -20 C gelagert. Zur Verhinderung eines schnellen Ausbleichens der Präparate am Mikroskop kann dem Einbettungsmittel N-Propylgallat zugegeben werden.

Als Verdünnung für Antikörperlösungen dient 10 % (v/v) FCS in PBS.

Immunfärbung

Adhärenente Zellen werden auf Glasdeckgläschen ausgesät, bei Erreichen der entsprechenden Zelldichte, mit PBS gewaschen und mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 20 min. bei RT fixiert.

Nachdem die Fixierlösung abgezogen wurde, werden die Deckgläschen mit PBS Alle Färbeschritte werden auf Parafilm durchgeführt. Dazu wird ein Tropfen von 12 µl Antikörperlösung auf ein Stück Parafilm gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Die Inkubationszeiten betragen im Allgemeinen 30 min bei 37°C, gewaschen wird standardmäßig dreimal mit PBS. Dazu gibt man 200µl PBS an den Rand des Deckgläschens auf den Parafilm, so daß sich die Flüssigkeit unter das Glasplättchen zieht und dieses aufschwimmt. Jedes Deckgläschen wird nacheinander in drei Bechergläser mit PBS getaucht. Die Inkubation mit dem entsprechendem Sekundärantikörper erfolgt analog dazu.

Im Anschluß werden die Deckgläschen auf einem Objektträger in Moviol eingebettet und mit Nagellack versiegelt. So können sie im Kühlschrank im Dunkeln längere Zeit gelagert werden.

Auswertung

Die Präparate werden mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135TV, 63er bzw. 100er Ölimmersionsobjektiv) mit Standard-Epifluoreszenzfiltern für Rhodamin und Fluorescein (GFP) betrachtet und ausgewertet.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzbildern wird entweder eine gekühlte CCD Kamera oder ein Fujichrome Sensia 400 bei einer Einstellung auf 1600 ASA verwendet. Die Wahl der Belichtungszeit und deren Steuerung wird von einer automatischen Belichtungseinheit übernommen. Der Film wird maschinell auf 800 ASA entwickelt, die elektronischen Bilder mit dem Programm Iplab und Adobe Photoshop bearbeitet.

3.6.5 Immunfluoreszenz von nicht-adhärenenten Zellen

Thrombozyten:

Verwendete Lösungen und Puffer:

- Thrombozyten-Resuspensionspuffer:

HEPES (pH 7.4)	10 mM
KCl	5 mM
NaCl	150 mM
Glucose	10 mM
MgCl ₂	1 mM

- 100 x CaCl₂-Lösung: CaCl₂ 100 mM

Wenn Thrombozyten in Gegenwart von Ca²⁺ mit Glasoberflächen in Kontakt kommen, beginnen sie zu adhären und sich auszubreiten (Zobel and Woods, 1983; Behnke and Bray, 1988). Auf diese Weise werden die Thrombozyten sehr gute Objekte für die Immunfluoreszenzmikroskopie.

Dafür kann Thrombozytenkonzentrat (3 x 10¹⁰ Thrombozyten/ml) (DRK Blutspendezentrale, Springe), das ein Tag vor seinem Verfalldatum ist, verwendet werden. Das Thrombozytenkonzentrat wird 20 min bei 420 xg abzentrifugiert, das Pellet 1:20 in Thrombozyten-Resuspensionspuffer + 1 mM CaCl₂ verdünnt und je 20 µl auf ein Glasdeckgläschen pipettiert. Nach 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer, sind die Thrombozyten auf dem Glas ausgebreitet und können mit Parafotmaldehyd fixiert werden.

Jurkat T-Zellen: Stimulierung an anti-CD3 mAk beschichteten Deckgläschen:

Jurkat T-Zellen werden aktiviert und heften sich dabei an Glasdeckgläschen an, die mit anti-CD3 Antikörpern beschichtet wurden, die an einen Teil des T-Zell Rezeptors binden.

Dazu werden Glasdeckgläschen 1 Stunde bei RT mit anti-CD3 Antikörpern (10 µg/ml TR66 in PBS) inkubiert, eine weitere Stunde mit 1% (v/v) FCS in PBS abgesättigt und dann mit PBS gewaschen. In PBS gewaschene Jurkat T-Zellen werden in 5% (v/v) FCS in PBS zu 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert und auf die vorbereiteten, beschichteten Deckgläschen pipettiert. Nach Inkubation von jeweils 2, 5, 15 und 30 min bei 37°C werden Deckgläschen in PBS gewaschen und mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert.

Jurkat T-Zellen: Stimulierung an anti-CD3 mAk beschichteten Dynabeads:

Werden anti-CD3 Antikörper an Latexbeads (= Kügelchen aus Latex) gekoppelt und diese mit Jurkat T-Zellen inkubiert, reorganisieren die T-Zellen ihr Aktinzytoskelett, so daß man eine große Ansammlung von F-Aktin an der Kontaktstelle zwischen Bead und T-Zelle beobachten kann. Auf diese Weise kann in einem einfachen System die T-Zell Rezeptor vermittelte Interaktion zwischen T-Zellen und "künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen" (Latexbeads) untersucht werden (Lowin-Kropf et al., 1998) Dazu werden 1×10^7 Latexbeads (Dynabeads, Ziege-anti-Maus mAk beschichtet, Dynal, mit einem Durchmesser von 4,5 µm) in 25 µl PBS mit 2 µg anti-CD3 Antikörpern (TR66) 1 Stunde bei 4°C inkubiert, in DMEM/HEPES/1%FCS gewaschen und in 200 µl DMEM/HEPES/1%FCS aufgenommen. Jurkat T-Zellen in kaltem DMEM/HEPES/1%FCS gewaschen und zu 5×10^6 Zellen in 50 µl aufgenommen. Die vorbereiteten Beads werden mit den Jurkat T-Zellen gemischt, zuerst 30 min auf Eis und dann 4 min bei 37°C inkubiert. Anschließend läßt man die Konjugate aus T-Zellen und Beads auf Glasdeckgläschen adherieren, die mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden und fixiert mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd für 20 min auf Eis. Auf diese Weise erhält man Präparate, die man mit Standardmethoden der Immunfluoreszenzmikroskopie untersuchen kann.

3.6.6 Immunpräzipitation

Protein Zellextrakte von Jurkat Zellen werden mit eiskaltem (4°C) RIPA Puffer (25 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 0,5 % (w/v) Deoxycholate; 0,1 % (w/v) SDS; 1 mM PMSF) hergestellt. Dazu werden etwa 4×10^8 nicht stimulierte oder mit Pervanadat stimulierte Jurkat Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml RIPA Puffer aufgenommen, mit einer 1 ml Pipette resuspendiert und eine halbe Stunde auf Eis gestellt. Nach 10 min. zentrifugieren bei 16 000 x g wird der Überstand abgenommen und bei -70°C gelagert.

0,2 ml des Jurkat RIPA Extraktes werden mit 0,8 ml Verdünnungs-Puffer (Tris-HCl 25 mM pH 7,6; NaCl 137 mM; BSA 1 mg/ml; 1 % (v/v) NP-40) verdünnt, mit der gleichen Menge an gereinigtem anti VASP monoklonalen Antikörpern IE226C2 (Abel et al., 1996) und gereinigten anti ActA monoklonalen Antikörpern (358C2) als Negativkontrolle für 1 h auf Eis inkubiert. Es wird je 50 µl Ziege-anti Maus IgG Agarose (Sigma) hinzugefügt und eine weitere Stunde auf einem Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert. Danach werden die Proben zweimal mit je 1 ml Verdünnungs-Puffer, einmal mit 1 ml TBS

(Tris-HCl 25 mM pH 7,6; NaCl 137 mM) und einmal mit 1 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 6,8 gewaschen und durch Western Blot analysiert.

3.6.7 Herstellung von Hybridomzelllinien zur Produktion monoklonaler Antikörper

(nach Peters und Baumgarten, 1990; Niebuhr et al., 1998)

Medien und Lösungen

- PEG-Fusionslösung:

5g PEG 4000 (Merck) werden bei 60°C (Wasserbad) in 5 ml Hepes gepuffertem DMEM-Medium gelöst, der pH mit NaOH auf 7,4 gebracht, die Lösung durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und aliquotiert.

- HA-Selektionsmedium:

OPTIMEM (Gibco) mit 5 % (v/v) FCS (Gibco), 4 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und zur Selektion 20 mg/l Hypoxanthin und 1,5 mg/l Azaserin (Sigma).

Immunisierung der Mäuse

Für die Versuche werden 4-10 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse verwendet, die von Harlan-Winkelmann bezogen werden. Für jedes Antigen werden 2 bzw. 3 Mäuse parallel immunisiert, um eine genügend große Anzahl an B-Lymphozyten zu erhalten. Den Mäusen werden jeweils 30-50 µl Antigen (entsprechen etwa 5-10 µg Protein) subcutan in die Hinterläufe injiziert. Die Immunisierungen erfolgen an den Tagen 17 (in kompletten Freund's Adjuvanz), 14 (in inkompletten Freund's Adjuvanz), 10, 7, 4 und 1 (in PBS) vor der Fusion, bei der die unter dem Kniegelenk sitzenden (poplitealen) Lymphknoten verwendet werden.

Isolierung von Peritonealmakrophagen

Die Mäuse werden durch Begasung mit CO₂ getötet und das Fell über der Bauchdecke vorsichtig abpräpariert. Mit einer feinen Kanüle (0,45 mm) werden 4 ml eiskaltes Medium (Optimem, GibcoBRL) in die Bauchhöhle injiziert und vorsichtig massiert. Die Bauchdecke wird mit einer Pinzette angehoben, und mit einer feinen Präparierschere ein kleines Loch geschnitten, durch das mit einer sterilen Pasteurpipette das Medium mit den Makrophagen aus der Bauchhöhle abgezogen werden kann. Die Makrophagen einer Maus werden auf 5 Platten mit mehreren "Wells" bzw. auf 10 Zellkultur-Petrischalen (100 mm) verteilt und als "Feeder"-Zellen für Hybridomzellen verwendet. Für eine Zellfusion werden die Makrophagen 3 Tage vorher in Selektionsmedium (s.u.) in 24-"Well"-Platten ausplattiert.

Präparation der Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten

Alle benötigten Medien und Lösungen werden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt

Die Mäuse werden durch Begasung mit CO₂ getötet und das Fell der Hinterläufe abpräpariert. Die poplitealen Lymphknoten, die sich direkt unter dem Kniegelenk befinden und durch die starke Schwellung relativ leicht zu erkennen waren, werden mit einer feinen Schere aus dem Gewebe herausgeschnitten. Nach zweimaligem Waschen in Optimum werden sie in angewärmtes Hepes gepuffertes DMEM Medium überführt und eventuell verbliebene Gewebsreste entfernt. Eine Zellsuspension wird hergestellt, indem die Lymphknoten mit einer feinen Schere angeschnitten und dann zwischen den aufgerauten Enden von Glas-Objektträgern gerieben werden. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 950 Upm (entspricht 169 x g) abzentrifugiert.

Vorbereitung der Myelomzellen

Die Maus-Myelomzellen (Ag8) werden in Optimum expandiert, so daß zum Zeitpunkt der Fusion 12 dichtbewachsene 100 mm Zellkultur Petrischalen mit den Zellen in optimalen Zustand in der logarithmischen Wachstumsphase zur Verfügung stehen (entsprechend etwa 4×10^8 Zellen). Die Zellen werden durch kräftiges Resuspendieren von den Schalen abgelöst, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 950 Upm (169 x g) pelletiert, mit Hepes gepuffertem DMEM Medium gewaschen und in einem einzigen 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt und nochmals abzentrifugiert.

Zellfusion

Die Myelomzellen und die Lymphozyten werden in Hepes gepuffertem DMEM-Medium aufgenommen und die Myelomzellen auf die Lymphozyten pipettiert, beide Zelltypen durch vorsichtiges Resuspendieren gemischt und zusammen bei 950 Upm (169 x g) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet durch leichtes Schütteln des Röhrchens aufgelockert und im Wasserbad auf 37°C gebracht. Innerhalb einer Minute wird tropfenweise 1 ml PEG Fusionslösung (s.u.) auf das Zellpellet gegeben, wobei das Röhrchen leicht geschüttelt wird. Für eine weitere Minute wird das Röhrchen in Wasserbad gestellt und dann das Polyethylenglykol langsam durch Zugabe von Hepes gepuffertem DMEM ausverdünn: 1 ml in 30 s, 3 ml in 30 s und schließlich 16 ml innerhalb einer Minute. Anschließend werden die Zellen 5 min. bei 37 C inkubiert, dann abzentrifugiert (800 Upm, 119 x g), in HA (Hypoxanthin/Azaserin)-Selektionsmedium aufgenommen und auf 15 x 24 "Well"-Platten mit Makrophagen ausplattiert. Das Selektionsverfahren zwischen Myelom- und Hybridomzellen basiert auf einem Enzymdefekt der Myelomzellen. Durch Zugabe von Azaserin wird der Hauptsyntheseweg der Purinbasen, die für die Synthese von Nukleinsäuren bereitgestellt werden müssen, blockiert. Normale Zellen verfügen über einen Reserveweg und können deshalb bei Zugabe von Hypoxanthin überleben.

Die Myelomzellen können dagegen diesen Reserveweg nicht nutzen, da sie nicht über das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase verfügen, so daß sie nach wenigen Tagen absterben. Die Lymphozyten, die nicht fusioniert sind, sind in Kultur nicht lange lebensfähig, so daß nur Zellen überleben, die aus der Fusion einer Myelomzelle (Immortalisierung) und eines Lymphozyten (Kompensation des Stoffwechseldefektes) hervorgegangen sind.

Nach 3-4 Tagen werden die Zellen durch Zugabe von frischem Selektionsmedium versorgt, und nachdem sich nach etwa 10 Tagen deutlich sichtbare Zellklone entwickelt haben, werden die Überstände der einzelnen "Wells" auf spezifische Antikörper untersucht. Die Zellen, deren Überstände in den Tests eine positive Reaktion zeigen, werden auf 6-"Well"-Platten expandiert und jeweils vier Kryoröhrchen pro "Well" eingefroren. Die Zellen werden etwa drei Wochen in Selektionsmedium kultiviert, bevor sie in normalem Optimum weitergezogen werden können.

Subklonierung

Da die einzelnen "Wells" nach der Fusion in der Regel mehrere Zellklone enthalten, müssen die Zellen durch Subklonierung vereinzelt werden, um definitionsgemäß monoklonale Antikörper (mAk) zu erhalten.

Die Zellen werden resuspendiert und die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Von der Zellsuspension wird eine Verdünnungsreihe von 500, 100, 25, 5 und 2,5 Zellen/ml hergestellt und von den einzelnen Verdünnungen je 100 µl/"Well" in vorbereitete 96-"Well"-Platten mit Makrophagen pipettiert, so daß man eine Platte mit je 4 Reihen mit 50, 10 und 2,5 Zellen /"Well" erhält und eine Platte, von der die Hälfte der "Wells" statistisch 0,5 Zellen und die andere Hälfte 0,25 Zellen enthält. Das Wachstum der Zellen wird mikroskopisch überprüft, und nach etwa 10 Tagen wird aus den "Wells", die einen einzelnen Klon enthalten, Überstand abgenommen und auf den Gehalt an spezifischen Antikörpern getestet. Bei positivem Resultat werden diese Klone expandiert, eingefroren und der Kulturüberstand für weitere Tests aufbewahrt. Zur Sicherheit werden die Einzelklone in der Regel ein zweites Mal subkloniert.

Kultivierung von Hybridomen im größeren Maßstab

Um größere Mengen an Kulturüberstand zur Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern zu gewinnen, werden die Hybridomzellen als Suspensionskulturen gehalten. Drei dicht bewachsene 100 mm-Petrischalen mit Zellen des betreffenden Klons (entsprechen etwa 10^8 Zellen) werden in eine 2 Liter Flasche umgesetzt, mit Medium auf 200 aufgefüllt und in einem Zellkulturbrutschrank (8 % CO₂ , 37°C) auf einer Rollerkulturanlage (Heraeus) inkubiert. Nach 7 Tagen wird mit Medium auf 400 ml aufgefüllt und die Zellen für eine weitere Woche inkubiert.

3.6.8 Reinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein A

Die monoklonalen Antikörper (mAk) werden aus Überständen von Hybridom-Suspensionskulturen isoliert. Der Kulturüberstand wird zunächst bei 10 000 Upm in einem GS3-Rotor abzentrifugiert und anschließend durch einen Faltenfilter (Whatman) gegeben. NaCl und Borat werden bis zu einer Endkonzentration von 3 M NaCl und 0,1 M Borat, pH 8,9 zugegeben. Die Lösung wird über eine Säule, die mit etwa 10 ml Protein A Sepharose gepackt war, geschickt.

Vor der Elution wird die Säule etwa mit 150 ml Waschlösung (3 M NaCl, 50 mM Borat, pH 8,9) gewaschen und zur Kontrolle die OD₂₈₀ der Waschlösung gemessen. Die Elution erfolge mit 0,1 M Citrat, pH 3,0 und das Eluat wird in 1,5 ml Fraktionen gesammelt, wobei zur Neutralisation des Eluats jeweils 100 µl Tris-HCl, pH 8,8 vorgelegt wird.

Die Antikörperkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wird durch Messung der OD₂₈₀ gegen das Elutionsmittel ermittelt. Fraktionen mit einer OD₂₈₀ über 1,0 werden vereinigt und gegen PBS dialysiert, Fraktionen mit einer OD₂₈₀ zwischen 0,1 und 1 werden mit Centriprep-10 Röhrchen (Amicon) umgepuffert und aufkonzentriert (5 000 x g, 4°C).

3.6.9 Herstellung polyklonaler Antikörper

Antiseren gegen Peptide oder rekombinante Proteine wurden von Eurogentec, Belgien hergestellt. Dazu wird ein lösliches, synthetisches Peptid, über ein zusätzliches Cystein am Carboxyterminus an Ovalbumin gekoppelt. Als Antigene können auch rekombinante Proteine verwendet werden, die als GST-Fusionsproteine hergestellt wurden, wobei für die Immunisierung dann vorher das GST abgespalten wird (siehe **3.4.4 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen**).

Kopplung von Peptiden an Ovalbumin

Zuerst wird das Ovalbumin aktiviert. Dazu wird 3 mg Ovalbumin in 200 µl Natriumphosphat-Puffer (500 mM Na₂HPO₄) gelöst, 2 mg Sulfo-MBS (Pierce) als Crosslinker dazugegeben und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Dann wird das aktivierte Ovalbumin über eine kleine Gelfiltrationssäule (PD-10, Pharmacia) aufgereinigt und daran das Peptid gekoppelt. Dafür werden 3 mg eines löslichen, synthetischen Peptids in Natriumphosphat-Puffer (500 mM Na₂HPO₄) gelöst zu dem aktivierten Ovalbumin hinzugefügt und 5 Stunden bei RT inkubiert. Diese Lösung wird so zum Immunisieren verwendet.

Kopplung von Peptiden an EAH-Sepharose

Für die Kopplung der Peptide an die EAH-Sepharose wird jeweils 20 mg Peptid in 700 µl 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,1 gelöst. Pro Peptid werden 3 ml EAH-Sepharose eingesetzt, mit 30 ml Phosphatpuffer

gewaschen, abzentrifugiert und in 5 ml Puffer aufgenommen. Als "Crosslinker", d.h. zur Einführung einer reaktiven Gruppe für die Peptidkopplung werden 8 mg Sulpho-MBS (Pierce) zugegeben und 3 h bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nachdem die Sepharose dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen wurde, werden die gelösten Peptide zugegeben und über Nacht auf einem Wipptisch inkubiert. Anschließend werden die restlichen reaktiven Gruppen der Sepharose durch Inkubation mit 10 % (v/v) FCS abgesättigt (2 h, RT). Ungebundene Proteine werden durch Waschen mit 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,8 und PBS entfernt. Die Säule ist nun gebrauchsfertig.

Herstellung einer Protein-Matrix für die Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

Da die Elution der pAk während der Affinitätsreinigung unter stark sauren Bedingungen (pH 2,7) erfolgt und unter diesen Bedingungen ein GST-Fusionsprotein auch von der Glutathion-Sepharose eluiert werden würde, muß das rekombinante GST-Fusionsprotein chemisch an die Sepharose gebunden werden. Hierfür wird das an die Glutathion-Sepharose gebundene GST-Fusionsprotein mit BS³ [Bis(sulfosuccinimidyl)suberat] (Pierce) chemisch quervernetzt. Dazu wird 14,3 mg BS³ in 4 ml PBS gelöst und zu 0,5 ml Bettvolumen eines an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteins hinzugefügt (Endkonz. 5 mM BS³), 30 min bei RT auf einem Rollinkubator bewegt, intensiv mit PBS und Acetatpuffer (pH 2,7) gewaschen.

Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper

Die polyklonalen Antiseren werden dreimal über die Protein- bzw. Peptid-Sepharose gegeben und mit dem 20 fachen Volumen PBS gespült. Der Vorwasch erfolge mit 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,8 und die Elution mit 0,2 M Actatpuffer, pH 2,7, wobei den Fraktionen Neutralisation 100 µl 1M Tris-HCl, pH 8,8 vorgelegt waren. Vom Eluat werden Fraktionen von 1,5 ml gesammelt, deren OD₂₈₀ bestimmt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

3.7 Gewebekultur

3.7.1 Verwendete Zelllinien

- | | | |
|---------------|---|--------------|
| - B16F1 | (Mausmelanom-Zelllinie) erhalten von K. Rottner, Inst. für Molekularbiologie, Akademie der Wissenschaften, Salzburg, Österreich | |
| - EL4 | (T-Lymphoma, murin) | ATCC TIB 39 |
| - HeLa | (Adenokarzinom, epithelial, human) | ATCC CCL 2 |
| - J774.A4 | (kurz "J774", Makrophagen-Zelllinie, murin) | ATCC TIB 67 |
| - Jurkat E6-1 | (kurz "Jurkat", T-Zelllinie, human) | ATCC TIB 152 |
| - PtK2 | (Nierenepithelzelllinie, Potorous tridactylis) | ATCC CCL 56 |

- P3X63Ag8.653 (kurz "Ag8", murine Myelomzelllinie) ATCC CRL 1580
- REF 52-2 (embryonale Ratten Fibroblasten-Zelllinie) erhalten von K. Rottner, Inst. für Molekularbiologie, Akademie der Wissenschaften, Salzburg, Österreich

3.7.2 Haltung und Passage

Die Zellen werden in Gewebekulturschalen Nunclon Delta (Nunc, Dänemark) mit je 20 ml Zellkulturmedium im Brutschrank (Forma Scientific) bei 37 °C und 8% (v/v) CO₂ kultiviert.

J774-Makrophagen werden in "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM, Gibco), PtK₂-Zellen in "Minimal Essential Medium" mit Earle's Salzen (MEM, Gibco) und Jurkat in RPMI 1640 (Gibco) gehalten. Als Zusätze wird den Medien jeweils 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS, Gibco) und 2 mM L-Glutamin (Flow) beigelegt. MEM wird zusätzlich nicht essentielle Aminosäuren (100 x sterile Lösung, Flow) zugesetzt.

Die adhärenz wachsenden Zellen werden alle 2-4 Tage passagiert. Durch Behandlung mit Trypsin (0,5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA in modifizierter "Puck's Saline", Gibco) werden sie zum Umsetzen vom Boden der Kulturschale abgelöst.

Die Myelom- und Hybridomzellen werden in OPTIMEM (Gibco) mit 5 % (v/v) FCS, 4 mM L-Glutamin (Flow), 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Umsetzen werden sie mit einer 10 ml Pipette kräftig resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

Die in Suspension wachsenden Jurkat Zellen werden alle 3-4 Tage mit einer 10 ml Pipette kräftig resuspendiert und im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren werden die Zellen in Medium suspendiert, in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min. bei 169 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in eiskaltem FCS mit 8 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Nunc) je 0,5 ml aliquotiert. In einer Styroporbox werden die Kryoröhrchen über Nacht bei - 70°C eingefroren. Anschließend werden sie in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff (bei - 170°C) gelagert.

Zum Auftauen werden die Zellen im 37°C Wasserbad erwärmt und in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt.

3.7.3 Transfektion von Gewebekulturzellen

Verwendete Puffer und Lösungen

- 2x HEBS-Puffer: (Hepes Buffered Saline)	NaCl	280	mM
	Hepes-Säure	46	mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5	mM
	pH 7,05		
- CaCl ₂ -Lösung:	CaCl ₂	2,5	M

Beide Lösungen werden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Vorbereitung der Gewebekulturzellen

Die Gewebekulturzellen werden zwei Tage vor der Transfektion in die "wells" (Vertiefungen) einer 24-well-Platte (Nunc, Dänemark) passagiert, die kleine, runde Deckgläschen (10 mm Durchmesser) enthalten. Da die Zellen adhärent auf den Deckgläschen wachsen, können sie auf diesen direkt für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Die optimale Zelldichte für eine Transfektion ist eine etwa 50 % Flächenbedeckung.

Am Tag der Transfektion werden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und mit je 1 ml Kulturmedium versorgt.

Herstellung der Präzipitate

Um DNA in eukaryontische Zellen transfizieren zu können, muß sie vorher in Calciumchlorid-Kristalle "verpackt" werden. Diese Kristalle bilden sich im neutralen Milieu durch Präzipitation von Calciumphosphat, welches aus dem CaCl₂ und dem Phosphat des HEBS-Puffers entsteht. Die Transfektionseffizienz kann stark erhöht werden, wenn die spezifische DNA zusammen mit Carrier-DNA verwendet wird. Diese unspezifische Träger-DNA wird meistens aus Zellen der zu transfizierenden Zelllinie gewonnen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist jedoch immer noch unklar.

Pro zu transfizierendes Deckgläschen werden 50 µl folgender Lösung hergestellt:

spezifische DNA	2	µg
Carrier-DNA	1	µg
CaCl ₂ -Lösung	5	µl

H₂O

ad 50 µl

In einem 1 ml Reaktionsgefäß (Eppendorff) wird die gleiche Menge an 2x HEBS-Puffer vorgelegt und auf einem Reagenzglasschüttler bei geringer Drehzahl geschüttelt. Der DNA-Ansatz wird dann langsam hinzutropft. Zu schnelles Hinzufügen führt zu größeren Präzipitaten, welche die Transfektionseffizienz stark verringern. Anschließend wird der Ansatz zum völligen Auskristallisieren für 30-60 min bei RT stehen gelassen.

Transfektion

Der Präzipitat-Ansatz wird noch einmal kurz geschüttelt, bevor davon dann je 100 µl pro "Well" zu den mit 1 ml Medium überschichteten Deckgläschen gegeben wird. Damit die Kristalle einen möglichst guten Kontakt zu den Zellen bekommen, werden sie durch 2 minütiges Zentrifugieren bei 500 x g auf die Zellen sedimentiert. Anschließend werden die Zellen für 6 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um die DNA aufzunehmen. Danach erfolgt ein Austausch des Mediums gegen normales Kulturmedium und eine Inkubation über Nacht.

Stabile Transfektion

Dazu wird eine transiente Transfektion in einer 60 mm Zellkulturschale durchgeführt, die Zellen nach 24 Stunden abtrypsinisiert und 1:10 bzw. 1:20 verdünnt auf 100 mm Schalen ausgesät. Nach weiteren 24 Stunden wird das normale Medium durch Medium ersetzt, dem 1 mg/ml G418 (Gibco BRL) zugesetzt wird. Nach weiteren 10 Tagen, wobei alle drei Tage das Medium ausgetauscht wird, können Einzelklone gepickt und in jeweils ein Well einer 24 Well Platte überführt werden (0,2-0,4 mg/ml G418). Diese Klone werden hochgezogen und die Klone, mit der stärksten Expression, werden eingefroren.

3.7.4 Mikroinjektion

Mikroinjektionen wurden mit einem automatischen Eppendorf-System (Micromanipulator 5170/ Microinjector 5242), das an einem Iversmikroskop (Zeiss, Axiovert 135TV) installiert ist, durchgeführt. Die Mikrokapillaren (GC100F-10, Science Products Trading GmbH, Farnkfurt/M.) werden dafür selbst gezogen. Sie werden zunächst vertikal in einen Apparat (Eigenbau der Werkstatt des MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) eingespannt und sind unten mit einem Gewicht beschwert. Die Mitte der Kapillare ist von einer Heizspirale umgeben, die durch Anlegen einer Spannung zum Glühen gebracht wird. Wenn die Kapillare an dieser Stelle zu schmelzen beginnt, wird die untere Hälfte von dem Gewicht heruntergezogen, so daß daraus zwei Nadeln mit sehr feinen Spitzen entstehen.

Die zu mikroinjizierenden Lösungen, die einen Proteingehalt von 1-6 mg/ml haben, werden zunächst bei 5 min (4°C) mit 100.000 xg in einer Tisch-Ultrazentrifuge (Beckmann) abzentrifugiert, um Aggregate und Staubpartikel abzutrennen. In die Kapillaren wird vorsichtig mit ausgezogenen "crystal tips" (Eppendorf) 1,5-2 µl der Lösung gefüllt und gewartet, bis die Lösung durch die Kapillarkräfte in die Spitze steigt.

4 Ergebnisse

Die EVH1-Domäne der Ena-VASP Proteinfamilie bindet an ein prolinreiches Aminosäuresequenz-Motiv (E/DFPPPPXDEE), das sich eindeutig von den anderen bekannten prolinreichen Proteinbindungsmotiven, wie die der SH3- und der WW/WWP-Domäne unterscheidet. Zu Beginn der Arbeit war diese Interaktion gerade in unserer Arbeitsgruppe anhand der Bindung zwischen dem Zytoskelettprotein VASP und dem listeriellen Oberflächenprotein ActA im Detail analysiert worden (Niebuhr et al., 1997). Ähnliche Bindungsmotive existieren auch in den Zytoskelettproteinen Zyxin und Vinculin. Während Vinculin schon länger bekannt ist und eingehend charakterisiert wurde (siehe Übersichtsartikel: Jockusch and Rüdiger, 1996; Rüdiger, 1998), war zu Beginn der Arbeit erst das Zyxin aus dem Huhn bekannt. Dieses Protein war als Zytoskelettprotein charakterisiert worden, das in fokalen Kontaktpunkten und in Stressfasern vorkommt. In der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners (D. von der Ahe, Kerckhoff Klinik, MPI, Bad Nauheim) war gerade die cDNA des humanen Zyxin kloniert worden. Weder für das Zyxin aus dem Huhn, noch für das humane Zyxin waren monoklonale Antikörper erhältlich und das gerade klonierte humane Zyxin, das in der Aminosäuresequenz in Teilbereichen nicht hoch konserviert war, war noch nicht charakterisiert.

Die Strategie, die daraufhin verfolgt wurde, war die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen humanes Zyxin, um damit wirksame und spezifische Werkzeuge für dessen weitere Charakterisierung zu erhalten.

4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Zyxin

Für die Immunisierung der Mäuse mußte zunächst das entsprechende Antigen vorbereitet werden. Dazu wurden geringe Mengen an humanem Zyxin partiell gereinigt. Ein polyklonales Antiserum eines Kaninchens, das mit elektrophoretisch aufgetrenntem und elektroeluiertem p83/Zyxin aus dem Schwein immunisiert worden war (AS83-1) (Reinhard et al., 1995 b) wurde für eine Immunpräzipitation aus Extrakten von humanen Thrombozyten verwendet. Dieses Antiserum reagierte in einem Western Blot von Thrombozytenextrakten aus dem Schwein mit einer 84 kDa großen Bande und mit einer Bande gleicher Mobilität in Extrakten aus humanen Thrombozyten und Fibroblasten (Reinhard et al., 1995 b). Dieses Immunpräzipitat wurde über ein präparatives SDS-Gel aufgetrennt, das entsprechende Gelstück ausgeschnitten und das Protein durch Elektroelution solubilisiert. Die Gesamtmenge an partiell gereinigtem humanen Zyxin betrug etwa 20 µg. Diese partielle Reinigung war zu Beginn der Arbeit schon von unserem Kooperationspartner Matthias Reinhard (Institut für Biochemie, Universitätsklinik Würzburg) durchgeführt worden und das Antigen wurde dankenswerterweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Mit diesem Material wurden drei Mäuse immunisiert. Die Überstände der aus der

Fusion hervorgegangenen Hybridom-Zellklone wurden sowohl im Western Blot als auch mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie auf spezifische Antikörper untersucht. Dazu wurde ein SDS-Totalextrakt aus HeLa-Zellen auf einem 10 % SDS-Gel separiert, geblottet und jeweils zwölf Überstände in einer Schlitzblotkammer (Biometra) parallel auf einem Western Blot getestet. Als Positivkontrolle wurde ein polyklonales Antiserum gegen humanes Zyxin verwendet, das freundlicherweise von Matthias Reinhard ebenfalls zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Antiserum (M5) war durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem über Immunpräzipitation und SDS-Gelelektrophorese partiell aufgereinigtem humanem Zyxin hergestellt worden. Dieses polyklonale Antiserum erkennt im Western Blot auf einem SDS-Extrakt von HeLa-Zellen eine 84 kDa große Bande, die dem humanen Zyxin entspricht. HeLa-Zellen wurden auf "8-Well" Objektträgern ausgesät, mit Paraformaldehyd fixiert, mit 0,1 % Triton-X100 permeabilisiert und mit den Überständen der Hybridome inkubiert. Aus Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit polyklonalen Antiseren gegen das Zyxin aus dem Huhn (Beckerle, 1986) und aus dem Schwein (Reinhard et al., 1995 b) war bekannt, daß Zyxin in den fokalen Kontaktpunkten und entlang der Stressfasern lokalisiert ist. Hybridom-Zellklone, deren Überstände in der Immunfluoreszenzmikroskopie fokale Kontaktpunkte und Stressfasern anfärbten und im Western Blot eine 84 kDa große Bande erkannten, wurden expandiert und eingefroren. Zwei Hybridom-Zellklone, 164 und 184, die eine besonders stark positive Reaktion gezeigt hatten wurden ausgewählt und zwei- bzw. dreifach subkloniert, bis sie auch auf dem Peptid-Scan nur noch ein einziges Epitop erkannten (siehe unten) und waren damit eindeutig monoklonal. Durch einen Subklassentest wurde festgestellt, daß diese monoklonalen Antikörper, 164D4 und 184A3, der Immunglobulin-Subklasse G1 angehören.

Im Western Blot auf Zellextrakten von HeLa Zellen erkennen beide Subklone nur eine Bande, die im SDS-Gel ein

ig 9).

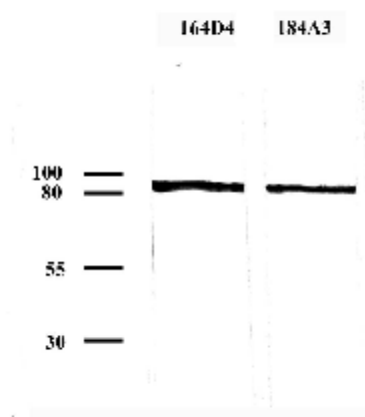


Abbildung 9: Die beiden monoklonalen anti-Zyxin Antikörper 164D4 und 184A3 wurden auf einem Western Blot eines Extraktes aus HeLa Zellen getestet.

4.1.1 Bestimmung der Epitope Zyxin-spezifischer monoklonaler Antikörper

Für die Charakterisierung monoklonaler Antikörper und die Deutung ihrer Reaktionen ist es von großem Nutzen, Aussagen über ihre Bindungsstellen treffen zu können. Eine Möglichkeit, solche Bindungsstellen (Epitope) zu identifizieren, ist die Untersuchung ihrer Bindung an synthetische Peptide. Auf diese Weise können allerdings nur lineare Epitope bestimmt werden, da dreidimensionale Strukturen von Bereichen, die in der Aminosäuresequenz weiter auseinander liegen, so nicht simuliert werden können.

Hierfür wurden die synthetischen Peptide nach der Spot-Synthesemethode (Frank, 1992) hergestellt. Die Peptide wurden durch subsequentes "Aufspotten" der Aminosäurederivate in Form von Punkten mit einem Durchmesser von ungefähr 2 mm an speziell derivatisiertes Whatman-Papier synthetisiert, und sind dadurch kovalent an die Papiermatrix gebunden. Diese sogenannten "Peptid-Scans" wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Ronald Frank (Abteilung Molekulare Erkennung, GBF; Braunschweig) hergestellt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Das Whatman-Papier mit den verschiedenen Peptiden, wobei in der Regel 25 verschiedene Peptide pro Reihe synthetisiert werden, ist mechanisch sehr stabil und kann sehr stringent gewaschen werden (z.B. mit organischen Lösungsmitteln, 8 M Harnstoff oder Acetatpuffer pH 3,0), ohne größeren Schaden zu nehmen. Für die Bestimmung der Epitope kann das Papier wie ein Western Blot verwendet werden (Niebuhr and Wehland 1997). Durch eine stringente Waschprozedur lassen sich die Antikörper wieder ablösen, so daß das Papier mehrfach verwendet werden kann. Um Farbreaktionen auf dem Papier zu vermeiden, die sich oft nur schwer wieder ablösen lassen, wurden die gebundenen Antikörper mittels Chemolumineszenz detektiert.

Die synthetischen Peptide haben jeweils eine Länge von 15 Aminosäuren und decken durch eine Verschiebung um jeweils drei Aminosäuren (d.h. zwei folgende Peptide haben eine gleiche Sequenz von zwölf Aminosäuren) die gesamte Aminosäuresequenz des humanen Zyxins ab. Das Peptid an Position 1 hatte demnach die Aminosäuresequenz 1-15 der Zyxin Sequenz, Peptid 2 entsprach den Aminosäuren 4-18, Peptid 3 den Aminosäuren 7-21 usw. und das letzte Peptid auf dem Papier den Aminosäuren 557-572.

Abbildung 10 zeigt ein Beispiel für die Reaktion eines monoklonalen Antikörpers mit den synthetischen Peptiden.



Abbildung 10: Bestimmung des Epitopes, das der monoklonale anti-Zyxin Antikörper 184A3 erkennt. Nach der Spot-Synthesemethode (Frank, 1992) wurden verschiedene Peptide auf ein Whatman Papier synthetisiert, die so gewählt waren, daß sie die gesamte Aminosäuresequenz des humanen Zyxin abdeckten. Sie haben eine Länge von jeweils 15 Aminosäuren und überschneiden sich in ihrer Sequenz in zwölf Aminosäuren, entsprechend einer Verschiebung jedes folgenden Peptides um drei Aminosäuren. Gezeigt ist die Reaktion des aminoterminal bindenden monoklonalen Antikörpers 184A3 (Spotnummer 1/23,1/24,1/25 und 2/1). Das Epitop befindet sich in der prolinreichen Region.

Mit Hilfe dieser Methode konnten die Bindungsstellen der beiden Zyxin-spezifischen monoklonalen Antikörper distinkten, linearen Bereichen des Zyxin-Proteins zugeordnet werden, die etwa eine Länge von sechs Aminosäuren umfassen.

Für eine weitere Eingrenzung der Epitope wurden nach der gleichen Methode Peptide synthetisiert, die eine Länge von 5 bis 12 Aminosäuren hatten und eine Verschiebung um jeweils nur eine Aminosäure aufwiesen. Dabei wurde für das erste Peptid jeweils eine Sequenz gewählt, die nach den bisherigen Ergebnissen gerade noch außerhalb des vermuteten Epitopes lag. Auf diese Weise konnten die Bindungsstellen der beiden monoklonalen Antikörper sehr gut charakterisiert werden.

In **Tabelle 1** sind die Reaktionen der Antikörper mit den einzelnen Peptiden aufgelistet:

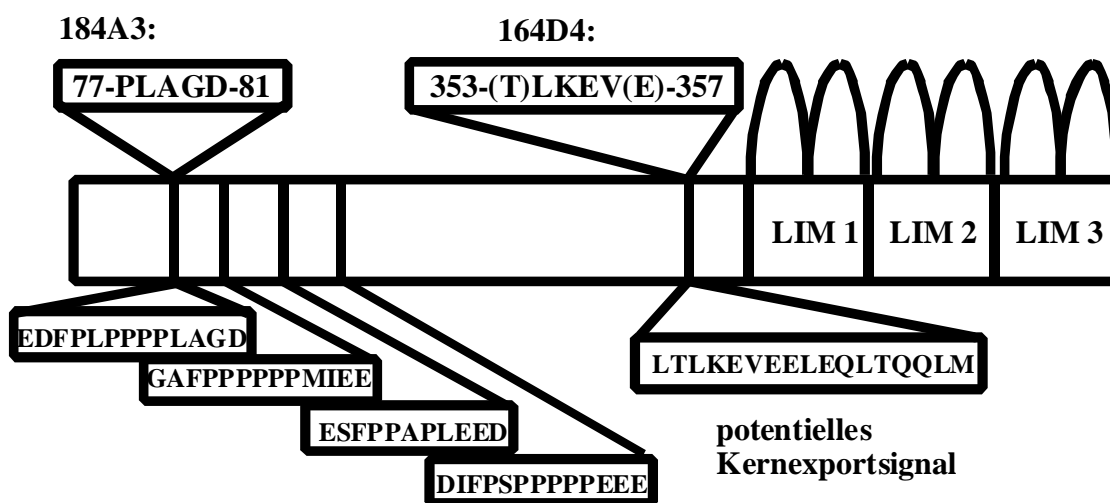
Antikörper	Zyxin184A3	Zyxin164D4
Sequenzen erkannter 15 As-Peptide (Überschneidung in drei Aminosäuren)	PPEDFPLPPP PPLAGD DFPLPPP PPLAGD GDD LPPP PPLAGD GDDAEG PPLAGD GDDAEGALG	RSPGAPGPL TLKEVE GAPGPL TLKEVEE EELE GPL TLKEVEE EELEQLT TLKEVEE EELEQLTQQL
Sequenzen erkannter 12 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	DFPLPPP PPLAGD FPLPPP PPLAGD G PLPPP PPLAGD GDD LPPP PPLAGD GDD PPP PPLAGD GDDA PP PPLAGD GDDAE P PPLAGD GDDAEG PPLAGD GDDAEGA	GAPGPL TLKEVE APGPL TLKEVEE PGPL TLKEVEE L GPL TLKEVEE EELE PL TLKEVEE EELEQ L TLKEVEE EELEQL TLKEVEE EELEQLT LKEVEE EELEQLTQ
Sequenzen erkannter 11 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	FPLPPP PPLAGD PLPPP PPLAGD G LPPP PPLAGD GDD PPP PPLAGD GDD PP PPLAGD GDDA P PPLAGD GDDAE PPLAGD GDDAEG	APGPL TLKEVE PGPL TLKEVEE GPL TLKEVEE L PL TLKEVEE EELE L TLKEVEE EELEQ TLKEVEE EELEQL LKEVEE EELEQLT
Sequenzen erkannter 10 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	PLPPP PPLAGD LPPP PPLAGD G PPP PPLAGD GDD PP PPLAGD GDD P PPLAGD GDDA PPLAGD GDDAE	PGPL TLKEVE GPL TLKEVEE PL TLKEVEE L L TLKEVEE EELE TLKEVEE EELEQ LKEVEE EELEQL
Sequenzen erkannter 9 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	LPPP PPLAGD PPP PPLAGD G PP PPLAGD GDD P PPLAGD GDD PPLAGD GDDA	GPL TLKEVE PL TLKEVEE L TLKEVEE L TLKEVEE EELE LKEVEE EELEQ
Sequenzen erkannter 8 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	PPP PPLAGD PP PPLAGD G P PPLAGD GDD PPLAGD GDD	GPL TLKEV PL TLKEVE L TLKEVEE TLKEVEE L
Sequenzen erkannter 7 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	PP PPLAGD P PPLAGD G PPLAGD GDD	PL TLKEV L TLKEVE TLKEVEE
Sequenzen erkannter 6 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	P PPLAGD PPLAGD G	TLKEVE
Sequenzen erkannter 5 As-Peptide (Überschneidung in einer Aminosäure)	PPLAGD	-
ermitteltes Epitop	PPLAGD	(T) LKEV (E)
As-Position im humanen Zyxin	77-81	352- 357

Tabelle 1: Mit Hilfe der Peptid-Spotsynthesemethode ermittelte Epitope der Zyxin-spezifischen monoklonalen Antikörper.

Der Antikörper 184A3 erkennt ein lineares Epitop von fünf Aminosäuren (77-PLAGD-81), wobei dafür selbst ein kurzes Peptid von fünf Aminosäuren ausreicht. Der Antikörper 164D4 erkennt ein lineares Epitop von vier Aminosäuren (352-(T)LKEV(E)-357). Die beiden flankierenden Aminosäuren sind aber auch für die Erkennung bzw. Präsentation nötig. Die Ergebnisse, die mit den kürzeren Peptiden erhalten wurden, können allerdings nur eingeschränkt berücksichtigt werden, da die Zugänglichkeit eines kleinen Peptides aus sterischen Gründen nicht unbedingt gegeben sein muß. Weiterhin ist zu beachten, daß der freie Aminoterminus am Ende der Peptide nicht den natürlichen Gegebenheiten entspricht.

Das Epitop des Antikörpers 164D4 liegt in dem von Nix und Beckerle postuliertem Kernexportsignal von Zyxin (Nix and Beckerle, 1997). Das Epitop des Antikörpers 184A3 befindet sich im Aminoterminus des humanen Zyxins im ersten prolinreichen Bindungsmotiv für die EVH1-Domäne von VASP und Mena (Niebuhr et al., 1997a) (siehe **Abbildung 11**).

Die von den Zyxin mAk erkannten Epitope:



Bindungsstellen der EVH1-Domäne der Ena/VASP Proteinfamilie

Abbildung 11: Schematische Übersicht der Domänenstruktur des humanen Zyxins (siehe auch Abbildung 1): Zusätzlich sind hier die Epitope der beiden monoklonalen Antikörper eingezeichnet. Der mAk 184A3 bindet am Ende der ersten potentiellen EVH1-Bindungstelle, während der mAk 164D4 am Anfang der Sequenz des potentiellen Kernexportsignals bindet.

4.1.2 Inhibierung der Antikörperbindung an Zyxin durch lösliche, synthetische Peptide

Um nachzuweisen, daß es sich hierbei wirklich um die von den monoklonalen Antikörpern erkannten Epitope handelt, wurde die Bindung der monoklonalen Antikörper an ihr Epitop in einem Kompetitionsassay inhibiert. Dazu wurden lösliche, synthetische Peptide, die den jeweiligen Epitopen entsprachen, im Überschuß zu den monoklonalen Antikörpern gegeben und in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die eingesetzten Peptide hatten die Sequenzen:

184A3 (73)-LPPP**PLAG**DGDD-(84)

164D4 (350)-GPL**TLKE**VEELE-(361)

Die löslichen Peptide der Epitope konnten effektiv die Bindung der mAk an Zyxin kompetitieren, so daß die Antikörper nicht mehr in der Lage waren die subzellulären Strukturen anzufärben, die für die Verteilung von Zyxin typisch sind (siehe auch **4.2 Subzelluläre Lokalisation von humanem Zyxin**).

Im Folgenden ist die gesamte Aminosäuresequenz des humanen Zyxins (Macalma et al., 1996; Trueb and Zumbrunn, 1996) und die Bindungsstellen der beiden monoklonalen Antikörper innerhalb dieser Sequenz aufgeführt. Die prolinreichen repetitiven Sequenzen sind fett markiert, die Epitope der monoklonalen Antikörper sind fett markiert und unterstrichen.

Humanes Zyxin (EMBL #X94991)

```

MAAPR PSPAI SVSVS APAFY APQKK FGPVV APKPK VNPFR
PGDSE PPPAP GAQRA QMGRV GEIPP PPPED FPLPP PPLAG 184A3
DGDDA EGALG GAFPP PPPI EESFP PAPLE EEIFP SPPPP
PEEEG GPEAP IPPPP QPREK VSSID LEIDS LSSLL DDMTK
NDPFK ARVSS GYVPP PVATP FSSKS STKPA AGGTA PLPPW
KSPSS SQPLP QVPAP AQSQT QFHVQ PQPQP KPQVQ LHVQS
QTQPV SLANT QPRGP PASSP APAPK FSPVT PKFTP VASKF
SPGAP GGSGS QPNQK LGHPE ALSAG TGSPQ PPSFT YAQQR
EKPRV QEKQH PVPPP AQNQN QVRSP GAPGP LTLKE VEELE 164D4
QLTQQ LMQDM EHPQR QNVAV NELCG RCHQP LARAQ PAVRA
LGQLF HIACF TCHQC AQLQ GQQFY SLEGA PYCEG CYTDT
LEKCN TCGEP ITDRM LRATG KAYHP HCFTC VVCAR PLEGT
SFIVD QANRP HCVPD YHKQY APRCS VCSEP IMPEP GRDET
VRVVA LDKNF HMKCY KCEDC GKPLS IEADD NGCFP LDGHV
LCRKC HTARA QT

```

4.2 Subzelluläre Lokalisation von humanem Zyxin

Die subzelluläre Lokalisation von Zyxin wurde ursprünglich mit dem Serum eines nicht immunisierten Kaninchens bestimmt, welches zufällig Antikörper gegen Zyxin enthielt und damit die Identifizierung des Zyxins aus dem Huhn ermöglichte (Beckerle, 1986). Es wurde gezeigt, daß Zyxin in Hühner-Zelllinien in fokalen Kontaktpunkten, Zell-Zell Kontakten und entlang der Aktinfilamentbündel, besonders wo sie an den fokalen Kontaktpunkten enden, lokalisiert ist. Dies konnte auch mit einem polyklonalen Serum (M2) einer Maus bestätigt werden, die mit biochemisch gereinigtem Zyxin aus dem Huhn immunisiert worden war (Crawford and Beckerle, 1991). Mit diesem M2 Antiserum wurde auch eine schwache periodische Färbung entlang der Stressfasern festgestellt (Crawford et al., 1992) und mit der subzellulären Lokalisation von α -Actinin verglichen. Hierbei wurde festgestellt, daß die Lokalisation der beiden Proteine zu einem großen Anteil, aber nicht vollständig gleich ist: Zyxin und α -Actinin kolokalisieren in fokalen Kontaktpunkten, entlang der Stressfasern und in Zell-Zell Kontakten. Hierbei findet sich Zyxin mehr in fokalen Kontaktpunkten und α -Actinin eher entlang der Stressfasern (Crawford et al., 1992). Das M2 Antiserum wurde auch für den Vergleich mit der subzellulären Verteilung des Zyxin Bindungspartners cCRP ("chicken Cystein Rich Protein") verwendet. In Fibroblasten des Huhns zeigten beide Proteine eine ähnliche Verteilung, wobei beide entlang der Aktinfilamentbündel, cCRP aber nur teilweise an den fokalen Kontaktpunkten und zusätzlich noch diffus im Zytoplasma detektiert wurden (Sadler et al., 1992).

Die subzelluläre Verteilung des humanen Zyxins wurde mit einem Antiserum aus einem Kaninchen untersucht, das mit elektrophoretisch aufgetrenntem und elektroeluiertem p83/Zyxin aus dem Schwein immunisiert worden war (AS83-1). Dieses Antiserum zeigte in der Western Blot Analyse eine Reaktion mit einer 84 kDa großen Bande auf Extrakten von Thrombozyten aus dem Schwein und eine Kreuzreaktion mit einer Bande gleicher Mobilität von Extrakten aus humanen Thrombozyten und Fibroblasten. In der Immunfluoreszenzmikroskopie färbte dieses AS83-1 Antiserum in humanen Haut-Fibroblasten fokale Kontaktpunkte, Stressfasern und die Peripherie von Lamellipodien. Eine identische Verteilung von VASP konnte mit einem polyklonalen Mausantiserum (S2) detektiert werden (Reinhard et al., 1995 b). Mit einem Kaninchen-Antiserum (B38) gegen ein Peptid aus der Aminosäuresequenz des humanen Zyxins (KKFGPVVAPKPK) konnte auch in HEL-Zellen fokalen Kontaktpunkten ähnliche Strukturen angefärbt werden. HEL-Zellen sind eine hämatopoietische Zelllinie, die durch Phorbol ester stimuliert auf Fibronectin adheriert (Macalma et al., 1996).

Da die verwendeten polyklonalen Antiseren nicht affinitätsgereinigt waren, läßt sich trotz Kontrollen nicht ausschließen, daß die Antiseren in der Immunfluoreszenzmikroskopie zusätzlich noch andere Proteine erkennen. Monoklonale Antikörper, deren Epitope bekannt sind, sind dagegen bessere

Reagenzien, um die subzelluläre Verteilung eines Proteins zu bestimmen. Um die mit den Antiseren erzielten Ergebnisse zu überprüfen, wurden deshalb die monoklonalen Antikörper verwendet, die gegen das humane Zyxin hergestellt worden waren.

Im Prinzip ließ sich die mit den polyklonalen Antiseren festgestellte subzelluläre Verteilung mit beiden monoklonalen Antikörpern bestätigen. Beide erkennen in humanen HeLa-Zellen die fokalen Kontaktpunkte. Die Aktinfilamente in den Stressfasern werden von beiden monoklonalen Antikörpern sogar gut erkannt und zeigen eine deutliche periodische Markierung (siehe **Abbildung 12** und **Abbildung 13**), die der periodischen Anordnung des α -Aktinin gleicht (siehe 4.3.2). Eine Kernlokalisierung von Zyxin wurde dabei nicht festgestellt.

Beide monoklonale Antikörper eignen sich sowohl für eine Fixierung der Präparate mit Paraformaldehyd als auch mit Methanol.

Der monoklonale Antikörper 184A3 ist in der Immunfluoreszenzmikroskopie und im Western Blot spezifisch für humanes Zyxin, damit übereinstimmend ist das von ihm erkannte Epitop auch nicht in der sonst hochkonservierten Aminosäuresequenz des murinen Zyxins zu finden. Der Subklon 164D4 ist von besonderem Interesse, da er ein hochkonserviertes Epitop erkennt und so für die Immunfluoreszenzmikroskopie weitgehend speziesunabhängig eingesetzt werden kann. So färbt er das gleiche Muster in der Nierenepithelzelllinie PtK₂ der Känguruh-Ratte, in der Rattenembryofibroblasten-Zelllinie REF-52-2 und in der Mausfibroblasten-Zelllinie Swiss-3T3 (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 12: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer humanen HeLa-Zelle, die mit dem mAk 184A3 gegen humanes Zyxin (A) und mit Phalloidin gegen F-Aktin (B) angefärbt wurde. Der Balken entspricht 10 μ m.

Abbildung 13: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer humanen HeLa-Zelle, die mit dem mAk 164D4 gegen humanes Zyxin (A) und mit Phalloidin gegen F-Aktin (B) angefärbt wurde. Der Balken entspricht 10 μ m.

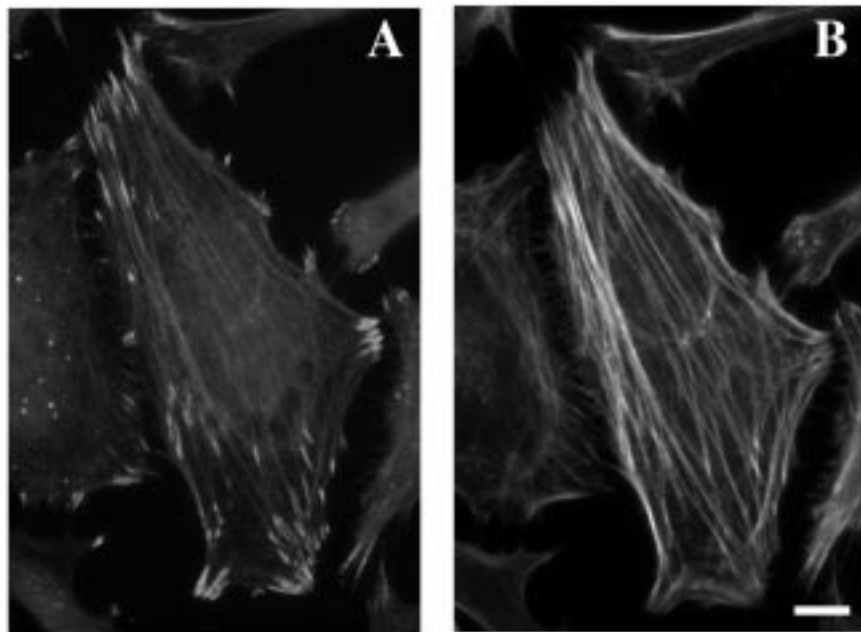


Abbildung 12

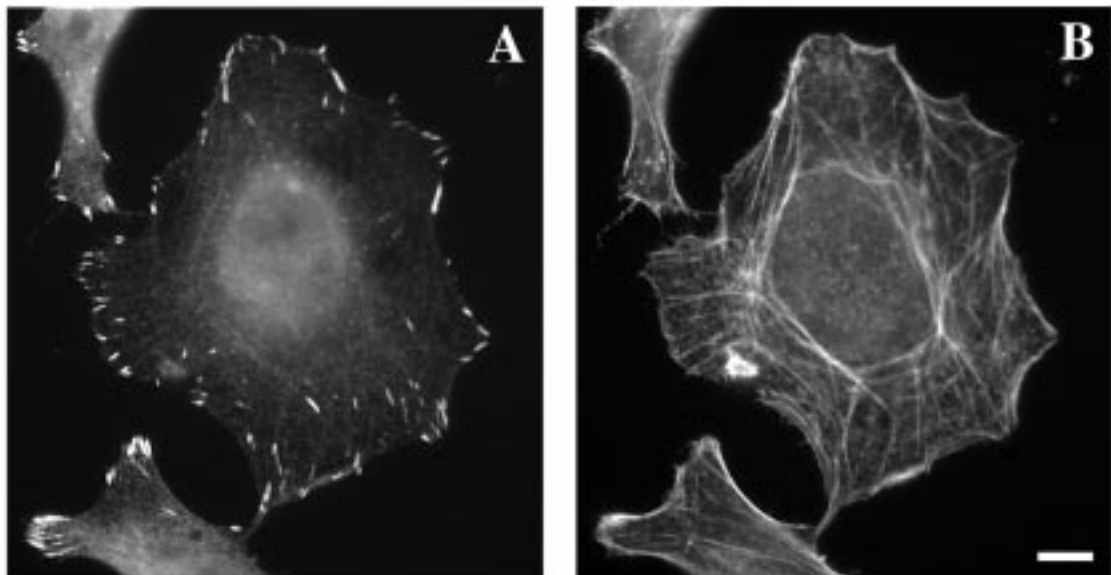


Abbildung 13

4.3 EGFP-Zyxin

Um die Dynamik von Zyxin in lebenden Zellen zu untersuchen und damit seine Rolle im Aktinzytoskelett aufzuklären, wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) an den Carboxyterminus des humanen Zyxin fusioniert. Dazu wurde die cDNA des humanen Zyxins (Macalma et al., 1996), die freundlicherweise von D. von der Ahe (Kerckhoff-Klinik, MPI, Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt wurde, in den Transfektions-Vektor pEGFP-N1 (Clontech) kloniert (siehe **Abbildung 14**).

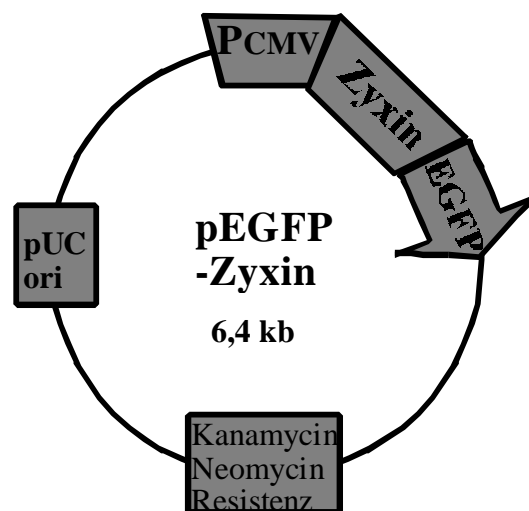


Abbildung 14: Schematische Übersicht über die Konstruktion des EGFP-Zyxin Vektors: Im Anschluß an den Eukaryonten-Promoter des Cytomegalie-Virus (pCMV), wurde die cDNA des humanen Zyxins im gleichen Leseraster mit der cDNA des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) kloniert. Weiterhin finden sich die Resistenzgene für die Selektion in Prokaryonten (Kanamycin) und Eukaryonten (Neomycin) und der Replikationsstartpunkt ("origin of replication") des Plasmids pUC auf dem pEGFP-Zyxin Plasmid.

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* kloniert, die im Nordwest Pazifik vorkommt (alle Referenzen für GFP siehe Übersichtsartikel: Cubitt et al., 1995). Durch intramolekulare Zyklisierung und Selbst-Oxidation durch Sauerstoff entsteht aus drei Aminosäuren, die hintereinander in der Aminosäuresequenz des GFP-Proteins liegen, ein Fluorophor, das nach Anregung mit blauem Licht grünes Licht emittiert. Diese Reaktion verläuft im Zytosol von eukaryoten wie prokaryoten Zellen unabhängig von anderen Proteinen und somit unabhängig von anderen Genprodukten von *Aequorea victoria*. Das GFP ist somit ein hervorragendes Werkzeug für die

Markierung von Proteinen in lebenden Zellen oder als Reportergen und wurde auch schon für die Analyse von Zytoskelettproteinen in lebenden Zellen mit Erfolg verwendet (z.B. GFP-Aktin, -Tubulin, -Vimentin, -Moesin, etc.) (Ludin and Matus, 1998). Dafür ist aber das ursprüngliche GFP-Protein nicht ideal, da es eine geringe Helligkeit, eine signifikante Verzögerung zwischen Proteinsynthese und Fluoreszenzentwicklung und komplexe Photoisomerisierungen aufweist. Deshalb wurde das GFP durch Mutation so verändert, daß es eine stärkere Fluoreszenz aufweist, die nicht so schnell ausbleicht ("Enhanced Green Fluorescent Protein", EGFP). Die cDNA dieses EGFP ist als Vektor, der für die Transfektion in Säugerzellen geeignet ist, kommerziell erhältlich (Clontech).

4.3.1 Untersuchung der Expression von EGFP-Zyxin

Die Expression des EGFP-Zyxin Konstruktes wurde in vier Zelllinien, NIH-3T3, B16F1 Mausmelanoma, PtK₂ und REF 52-2, getestet. Das EGFP-Zyxin wurde in allen vier Zelllinien nach Transfektion exprimiert, was darauf schließen läßt, daß die Expression und Funktion dieses Konstruktes nicht auf bestimmte Zelllinien beschränkt ist.

EGFP-Zyxin ist in diesen Zelllinien in den fokalen Kontaktpunkten und in einer periodischen Verteilung in den Aktin-Stressfasern lokalisiert. Dieses ist dieselbe subzelluläre Verteilung, die mit den monoklonalen Antikörpern festgestellt wurde (siehe **Abbildung 15** und **Abbildung 16**).

Abbildung 15: Transiente Transfektion einer PtK₂ Zelle mit EGFP-Zyxin: EGFP-Zyxin ist in PtK₂-Zellen in den fokalen Kontaktpunkten und in den Aktin-Stressfasern in einer periodischen Anordnung lokalisiert. Die Länge des Balken entspricht 5 µm.

Abbildung 16: Transiente Transfektion einer PtK₂ Zelle mit EGFP-Zyxin: Diese Vergrößerung zeigt eindeutig die periodische Anordnung des EGFP-Zyxins in den Aktin-Stressfasern. Die Länge des Balken entspricht 5 µm.

Um zu zeigen, daß die Verteilung von EGFP-Zyxin und endogenem Zyxin nicht zu unterscheiden ist, wurden EGFP-Zyxin exprimierende REF 52-2 Zellen fixiert und mit dem monoklonalen Antikörper gegen humanes Zyxin 164D4 und einem Cy3-markiertem Sekundärantikörper angefärbt (siehe **Abbildung 18**).

4.3.2 EGFP-Zyxin und α -Aktinin kolokalisieren exakt in der gleichen periodischen Anordnung in Stressfasern

Da die in der Immunfluoreszenzmikroskopie festgestellte periodische Anordnung des humanen Zyxins entlang der Stressfasern sehr der bekannten periodischen Anordnung des α -Aktinin gleicht, sollte

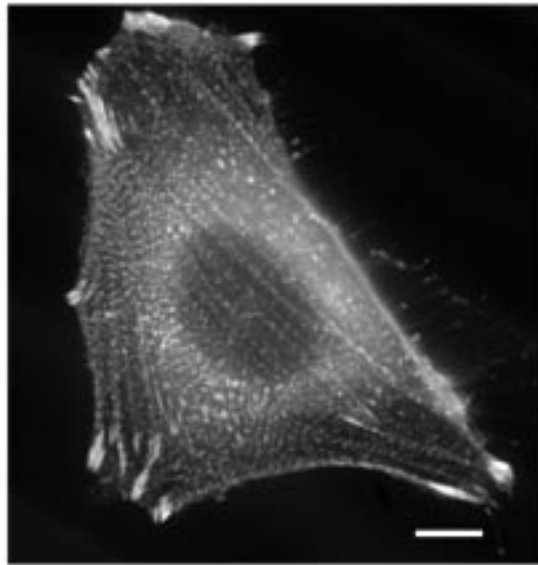


Abbildung 15

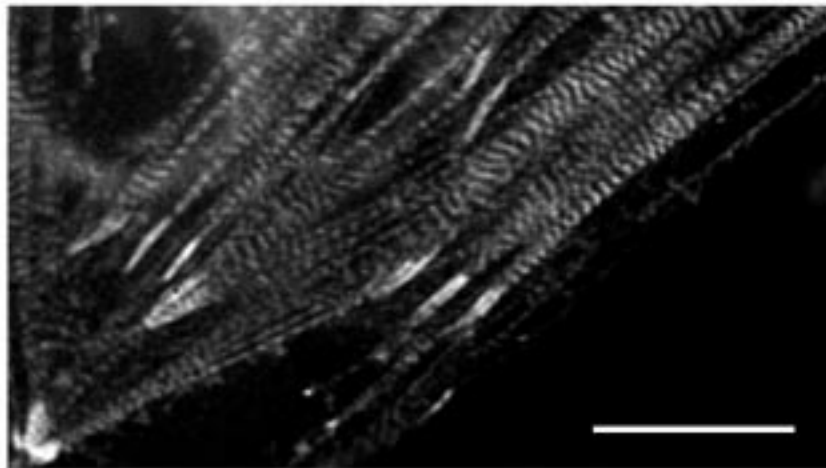


Abbildung 16

überprüft werden, ob Zyxin mit α -Aktinin exakt in dieser periodischen Anordnung an Stressfasern kolokalisiert ist. Dazu wurden PtK₂-Zellen transient mit EGFP-Zyxin transfiziert und nach Fixierung mit monoklonalen Antikörpern gegen α -Aktinin (BM-75.2 Sigma # A5044) angefärbt. Hiermit ließ sich zeigen, daß Zyxin und α -Aktinin exakt in der gleichen periodischen Anordnung in Stressfasern kolokalisiert sind (siehe **Abbildung 17**).

Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PtK₂-Zelle die mit EGFP-Zyxin transient transfiziert und mit α -Aktinin Antikörpern angefärbt wurde. In (A) ist die α -Aktinin Färbung, in (B) die EGFP-Zyxin Fluoreszenz und in (C) die Überlagerung der beiden Aufnahmen mit Falschfarben gezeigt. α -Aktinin ist rot und EGFP-Zyxin grün eingefärbt. Der Balken entspricht 10 μ m.

4.4 EGFP-Zyxin exprimierende stabile Zelllinien

In Zusammenarbeit mit Klemens Rottner (Institut für Molekularbiologie, Akademie der Wissenschaften, Salzburg, Österreich) wurden drei Zelllinien, die Maus-Fibroblastenlinie NIH-3T3, die Rattenembryo-Fibroblastenlinie REF 52-2 und die Mausmelanomlinie B16F1, durch G418-Selektion stabil transfiziert und analysiert. Die erfolgreiche Etablierung dieser EGFP-Zyxin exprimierenden Zelllinien, zeigt, daß die Zellproliferation nicht durch EGFP-Zyxin blockiert wird.

4.4.1 Dynamik von EGFP-Zyxin in lebenden Zellen

Zuerst wurde die Dynamik von Zyxin in sich ausbreitenden lebenden Säugerzellen mit der digitalen Videomikroskopie untersucht. Eine stabile EGFP-Zyxin exprimierende REF 52-2 Zelllinie wurde auf Glasdeckgläschen ausplattiert und das Anheften und Ausbreiten der Zellen dokumentiert. EGFP-Zyxin konnte in der Lamelle sich ausbreitender Zellen detektieren werden (siehe **Abbildung 18 A** Bild bei 0 min: der Pfeil zeigt auf die Lamelle), bevor es in entstehende fokale Komplexe eingebaut wurde (siehe **Abbildung 18 A** Bild bei 2 min: die Pfeilspitze zeigt auf einen fokalen Komplex). Nachdem das EGFP-Zyxin in den fokalen Komplexen detektiert werden konnte, breiteten sich die Lamellipodien ohne EGFP-Zyxin an ihren Spitzen aus (siehe **Abbildung 18 A** Bilder 2-8 min: die Pfeile zeigen auf die Lamellipodien). Während des weiteren Ausbreitens der REF 52-2 Zellen verblieb das EGFP-Zyxin in den reifenden fokalen Kontaktpunkten (siehe **Abbildung 18 A und B** die Pfeilspitzen zeigen auf einen fokalen Kontakt).

Als nächstes wurde die Dynamik von Zyxin in stationären Zellen untersucht. B16F1 Maus-Melanomzellen sind stationär, wenn sie auf Fibronectin-beschichteten Glasdeckgläschen wachsen. Ihr Aktinzytoskelett ist charakterisiert durch zahlreiche Stressfasern und ein intensives "Ruffling" der Membran an den Zellrändern (Ballestrem et al., 1998).

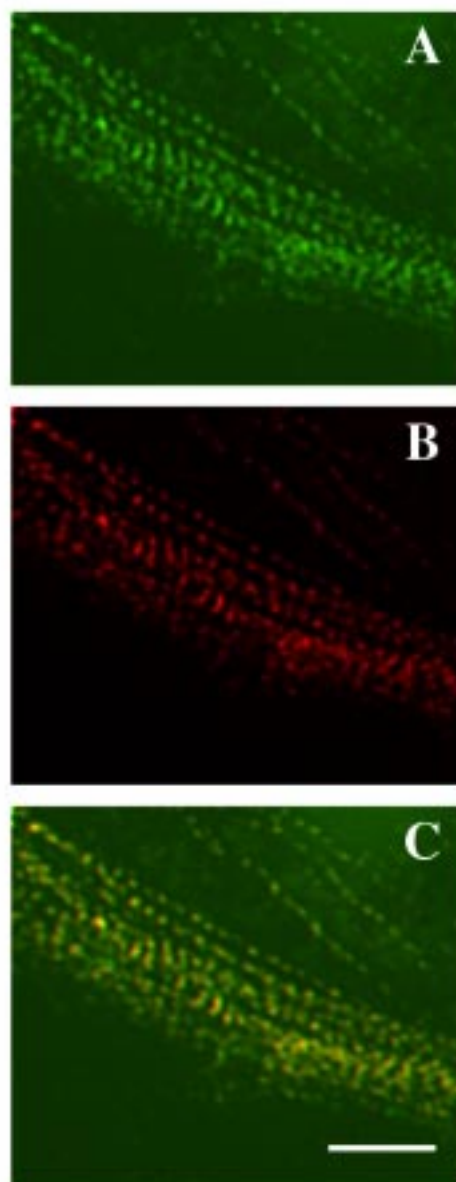


Abbildung 17

Transient mit EGFP-Zyxin transfizierte B16F1-Zellen wurden auf Fibronectin-beschichteten Glasdeckgläschen ausplattiert und ihr dynamisches Verhalten mit Hilfe der Fluoreszenz-Videomikroskopie ausgewertet.

EGFP-Zyxin findet sich in fokalen Kontaktpunkten, in Stressfasern und in Membran-ruffles in Aktinfilamentbündeln in einem periodischen Muster (siehe **Abbildung 19** im Bild bei 6': die Pfeilspitze zeigt auf einen fokalen Kontakt und der Pfeil auf eine Stressfaser). Diese Aktinfilamentbündel bewegten sich in den Membran-ruffles dynamisch. (siehe **Abbildung 19** im Bild bei 15': der Pfeil deutet auf diese Aktinfilamentbündel hin). Unterhalb der Ruffle konnte der Einbau und das Verschwinden von Zyxin aus fokalen Kontaktpunkten verfolgt werden. Dieses könnte der Bildung und dem Abbau fokaler Kontaktpunkte entsprechen (siehe **Abbildung 19**).

Abbildung 18: Digitale Videomikroskopie einer stabilen EGFP-Zyxin exprimierenden REF 52-2 Zelllinie. (A) Der Film wurde 15 Minuten nach dem Replattieren gestartet. Die Pause zwischen den Bildern beträgt 30 Sekunden. Gezeigt sind nur die Bilder bei 0', 2', 4', 8' und 13'30". Der Pfeil auf dem Bild bei 0 min zeigt auf die Lamelle in der noch GFP-Zyxin detektiert werden kann. Die Pfeilspitze auf dem Bild bei 2 min zeigt auf einen fokalen Komplex. Die Pfeile auf den Bildern bei 2, 4 und 8 min zeigen auf die Lamellipodien und die Pfeilspitzen in den Bildern bei 2'-13'30" auf einen fokalen Kontakt. (B) Nach der letzten Aufnahme wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit dem monoklonalen anti-Zyxin Antikörper 164D4 angefärbt. Der Balken entspricht 10 µm.

Abbildung 19: Digitale Videomikroskopie von transient mit EGFP-Zyxin transfizierten B16F1 Maus-Melanomzellen auf Fibronectin-beschichteten Glasdeckgläschen. Die Pause zwischen den Frames beträgt 30". Gezeigt sind nur die Bilder bei 6', 9', 12', 15', 18' und 21'. Im Bild bei 6' zeigt die Pfeilspitze auf einen fokalen Kontakt, während der Pfeil auf eine Stressfaser deutet. Der Pfeil im Bild bei 15' deutet auf sich dynamisch bewegende Aktinfilamentbündel hin. Der Balken entspricht 10 µm.

4.5 Zyxin und Vinculin haben *in vivo* eine unterschiedliche Dynamik

4.5.1 Zyxin und Vinculin werden zum gleichen Zeitpunkt in fokaler Komplexe eingebaut

Um *in vivo* die Dynamik von Zyxin und Vinculin in der gleichen Zelle zu vergleichen, wurden transient transfizierte B16F1-Zellen auf Fibronectin-beschichteten Glasdeckgläschen ausplattiert und in diese Zellen Rhodamin-markiertes Vinculin mikroinjiziert. Diese Zellen wurden dann mit der Fluoreszenz-Videomikroskopie beobachtet.

Zyxin und Vinculin werden gleichzeitig in entstehende fokale Komplexe eingebaut, die sich in der Nähe der Ruffles bilden (siehe **Abbildung 20** im Bild bei 3': Pfeilspitze). Durch den zeitlichen Abstand der

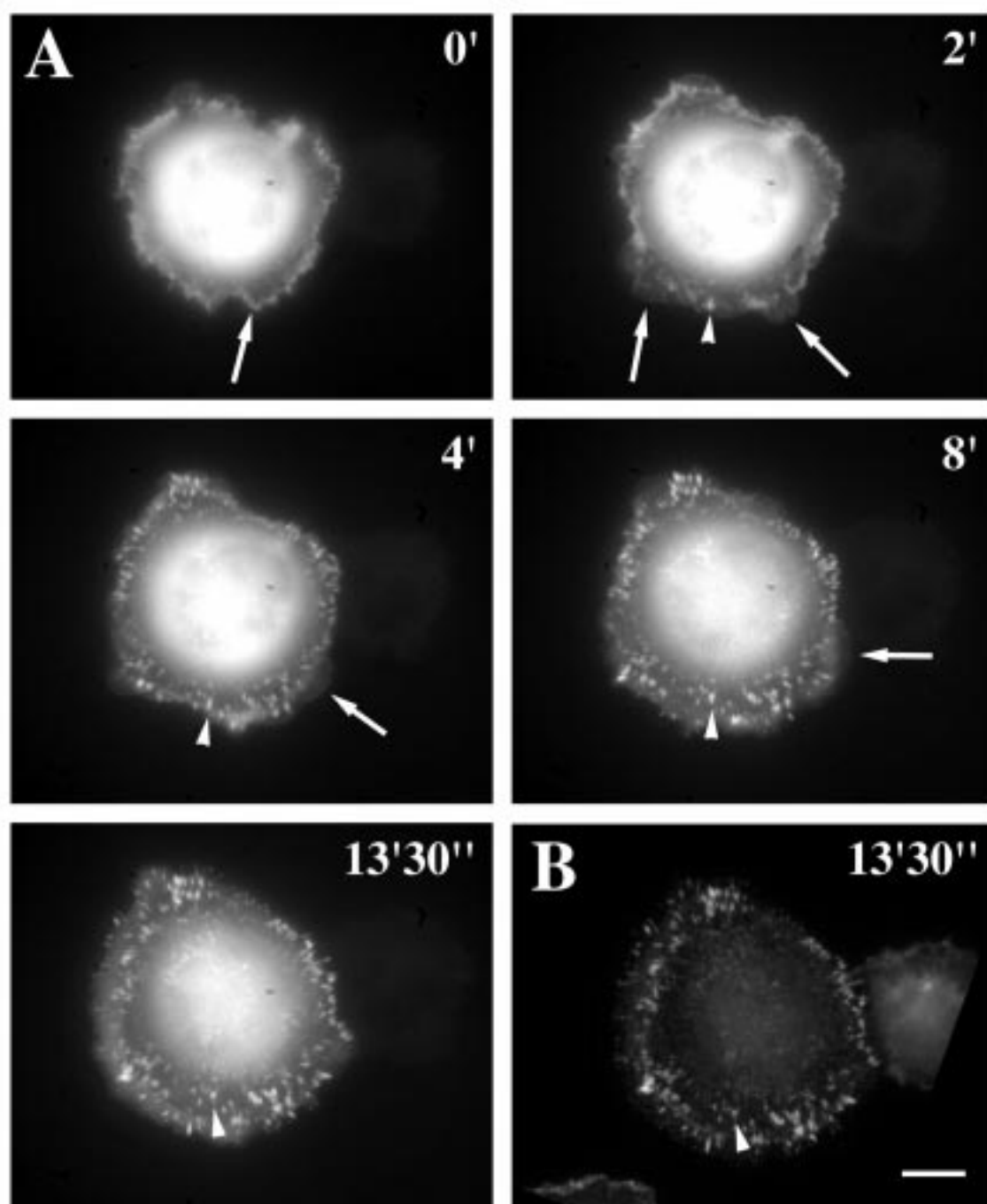


Abbildung 18

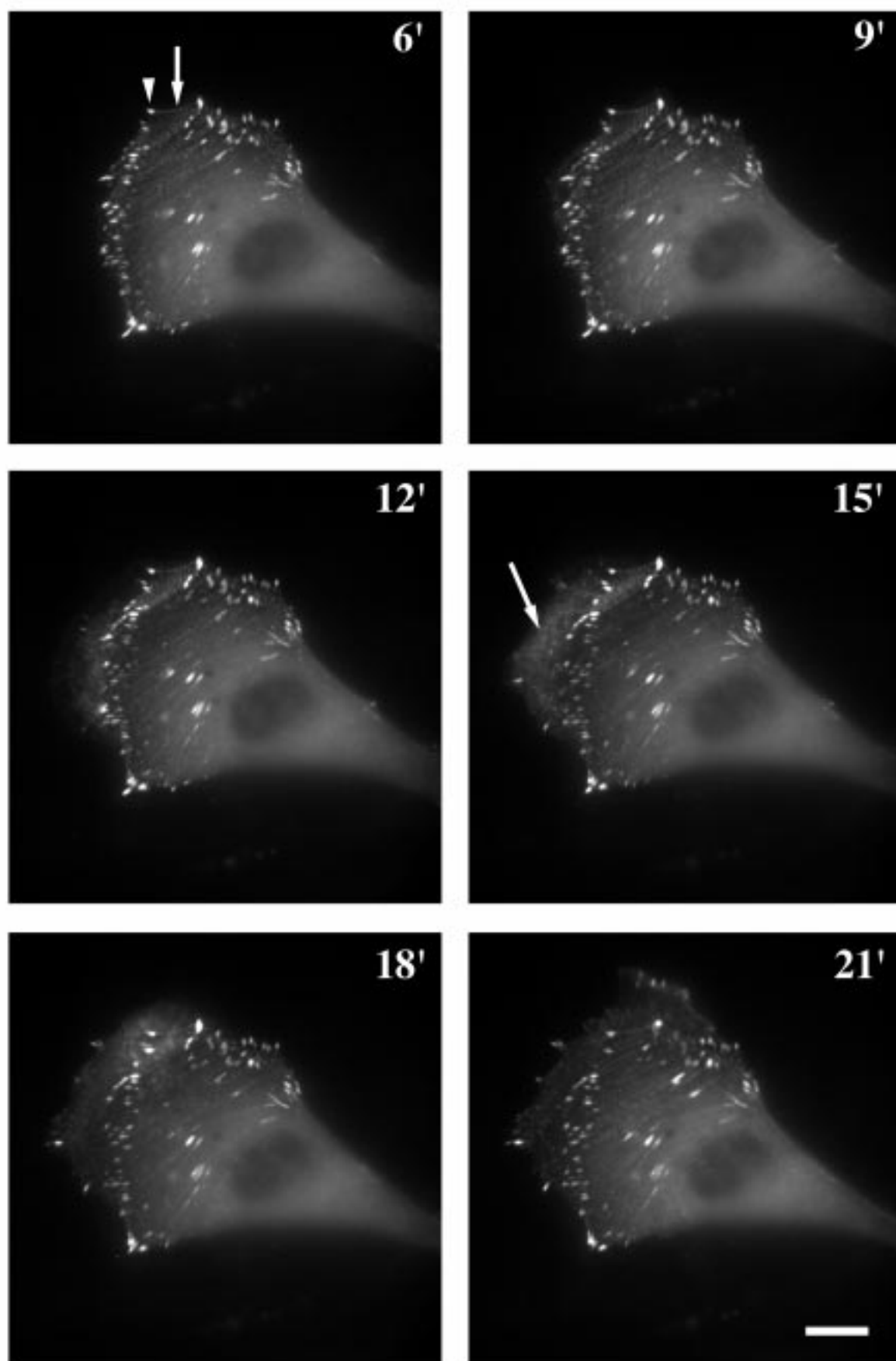


Abbildung 19

einzelnen Bilder der Fluoreszenz-Videomikroskopie, der hier eine Minute beträgt ist diese Aussage aber nur für die beobachtete Zeitauflösung gültig.

EGFP-Zyxin findet sich auch in dieser Zelllinie in einem periodischen Muster in den Stressfasern. Besonders ausgeprägt war dieses periodische Muster von Zyxin auch in Aktinbündeln in den Membranruffles, während Vinculin dort nicht zu finden war (siehe **Abbildung 20**).

4.5.2 Vinculin und Zyxin haben während Reifung und Bewegung fokaler Kontaktpunkte eine unterschiedliche Dynamik

In den gleichen B16F1-Zellen, wie unter **4.5.1** beschrieben, ließ sich beobachten, daß Zyxin bei der Reifung fokaler Komplexe in diesen in einer scharf begrenzten Fläche an der Spitze des fokalen Kontaktpunktes verbleibt, während die Markierung von Vinculin deutlich breiter wird.

Während des Abbaus und der Bewegung von fokalen Kontaktpunkten verschwindet Zyxin schnell (siehe Z3'-Z6'), Vinculin aber verbleibt länger (siehe V3'-V15') und wird mitgezogen, währenddessen seine Färbung breiter wird und schließlich auch nicht mehr detektierbar ist (siehe **Abbildung 20**: die Pfeile zeigen auf einen fokalen Kontaktpunkt).

Abbildung 20: Vergleich der in vivo Dynamik von Zyxin und Vinculin. Digitale Videomikroskopie von transient mit EGFP-Zyxin transfizierten B16F1 Maus-Melanomzellen auf Fibronektin-beschichteten Glasdeckgläschen in die Rhodamin-markiertes Vinculin durch Mikroinjektion eingeführt wurde. Z 3'-Z 15' zeigt Bilder des Videos der EGFP-Zyxin Fluoreszenz und V 3'-V 15' die korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen derselben Zelle, die zusätzlich mit Rhodamin-markiertem Vinculin mikroinjiziert worden war. Die Pause zwischen den Bildern beträgt 1 Minute, gezeigt werden aber nur die Bilder bei 3, 6 und 15 Minuten. Die Pfeilspitze in den Bildern Z3' und V3' zeigt auf denselben fokalen Komplex und der Pfeil in den Bildern Z3', V3', Z 6' und V6' auf einen fokalen Kontakt. Der Balken entspricht 10 µm.

4.6 Suche nach neuen Bindungspartnern der EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteinfamilie

Polyklonale, affinitätsgereinigte Antikörper (anti-ActA #99), die gegen ein Peptid hergestellt wurden, welches das EVH1-Bindungsmotiv in dem listeriellen Oberflächenprotein ActA enthielt, (SFEFPPPPTDEELRL) erkannten in einem Western Blot mit Komplettlysaten von HeLa-Zellen Zyxin, Vinculin und vier zusätzliche Banden (Niebuhr et al., 1997) (siehe **Abbildung 21**; Abbildung entnommen aus Niebuhr et al., 1997).

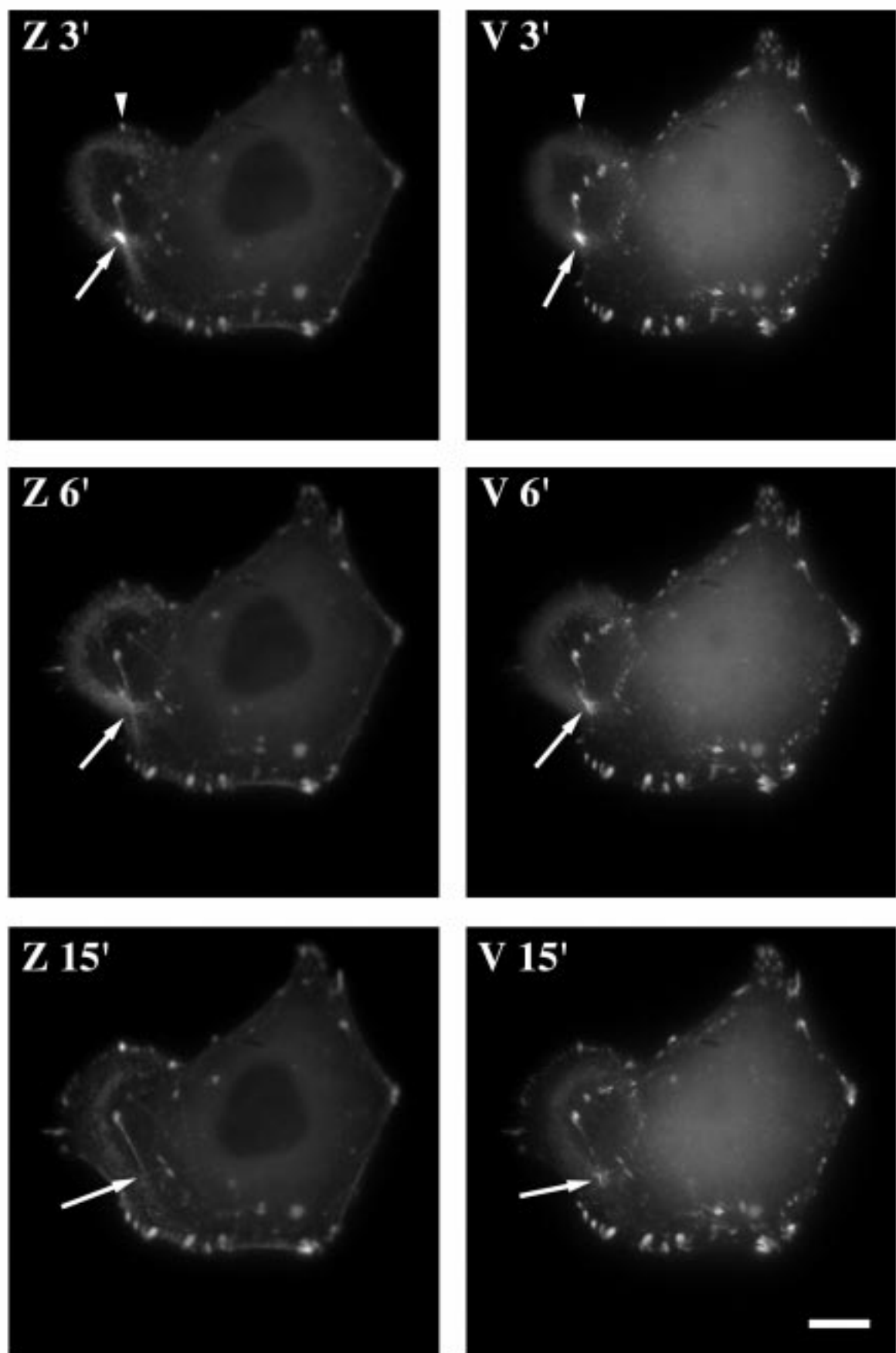


Abbildung 20

Dieser Hinweis ließ erwarten, daß es noch mehrere, bisher unbekannte zelluläre Proteine geben sollte, die Bindungsstellen der EVH1-Domänen enthalten und damit auch eine Rolle im zellulären Aktin-Polymerisationsprozeß spielen sollten.

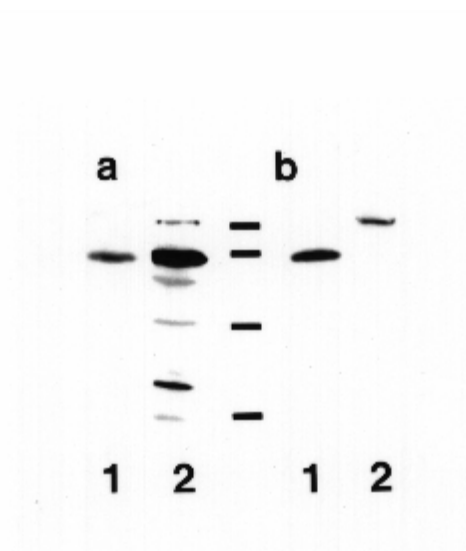


Abbildung 21: In (a) ist ein Western Blot mit Komplettlysaten von HeLa-Zellen mit dem polyklonalen anti-ActA (#99) Antikörpern gezeigt. Spur 1 entspricht einer kürzeren und Spur 2 einer längeren Expositionszeit des gleichen Western Blot in der Chemolumineszenz. In (b) ist ein korrespondierender Western Blot auf demselben Extrakt aus HeLa-Zellen mit anti-Zyxin (Spur 1) und anti-Vinculin (Spur 2) Antikörpern dargestellt. Die Proteinmolekulargewichtsmarker entsprechen von oben nach unten: 112, 84, 53 und 35 kDa. Die Abbildung wurde aus Niebuhr et al., 1997 entnommen.

4.7 Klonierung von Fyb/SLAP, ein potentieller Bindungspartner der EVH1-Domäne

Diese affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper (anti-ActA #99) wurden dazu verwendet, eine Maus-Expressionsbibliothek zu screenen, um unbekannte Proteine, die dieses EVH1-Bindungsmotiv enthalten, zu klonieren. Nach der "Plaue"-Reinigung und Sequenzierung von 15 positiven Klonen, stellte sich heraus, daß nur einer der Klone (5/7) von [³²P] markiertem GST-Mena EVH1 Protein in einem "Blot Overlay Assay" gebunden wurde (Daten nicht gezeigt) und ein potentielles Bindungsmotiv der EVH1-Domänen enthält. Der Klon 5/7 enthält das Aminosäuresequenzmotiv (MFPPPTDD), daß sehr gut mit der prolinreichen Bindungsstelle der EVH1-Domänen im ActA (E/DFPPPTD/E) übereinstimmt. Sowohl das Kernmotiv (FPPPP), als auch die sauren Aminosäuren, die ihm folgen, stimmen mit dem bisher ermittelten Konsensusmotiv für die Bindung der EVH1-Domänen überein. Da die EVH1-Domänen auch an Motive binden, die, wie es in Zyxin zu finden ist, keine sauren Aminosäuren direkt vor dem Phenylalanin enthalten (Niebuhr et al., 1997), ist anzunehmen, daß es sich um ein echtes Bindungsmotiv der EVH1-Domänen handeln könnte. Mit der Sequenzinformation dieses 360 bp Partialklones wurde die "Expressed sequence tag" (EST) Datenbank am National Center for

Biotechnology Information (NCBI) durchsucht und ein homologer humaner EST-Klon gefunden. Die doppelsträngige Sequenzierung dieses EST-Klons zeigte, daß er eine 2,3 kb große cDNA voller Länge enthält, die für ein bis dahin unbekanntes Protein kodiert. Während der weiteren Charakterisierung dieses Proteins erschienen die Sequenzen von Fyb (Fyn binding protein) (Da Silva et al., 1997 b) und SLAP-130 (SLP-76 associated protein of 130 kD) (Musci et al., 1997) in den Datenbanken, die eine hohe Homologie zu dem EST-Klon aufweisen.

Fyb und SLAP-130 wurden als Protein kloniert, das an die SH2-Domäne der Tyrosin-Kinase Fyn und an die SH2-Domäne des T-Zell Adapterproteins SLP-76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kD) bindet. Durch Northern-Blot Analyse wurde festgestellt, daß Fyb/SLAP nur in peripheren Blutlymphocyten, dem Thymus und der Milz exprimiert wird. In lymphoiden Zellen wird Fyb/SLAP nur in gereinigten peripheren T-Zellen, T-Zelllinien, myeloiden Zelllinien (HL-60), nicht aber in gereinigten peripheren B-Zellen und B-Zelllinien exprimiert (Da Silva et al., 1997 b).

Fyb und SLAP-130 sind identisch in ihrer Sequenz, unterscheiden sich aber von dem EST-Klon in zweierlei Hinsicht: Erstens enthält der EST-Klon ein zusätzliches Insert von 131 bp und zweitens ein kürzeres Ende in einem anderen Leseraster als Fyb/SLAP. Die Sequenzierung von mehreren Klonen von drei unabhängig durchgeführten RT-PCR vom Carboxyterminus von Fyb/SLAP aus HL60-Zellen, ergab ein 700 und ein 840 bp langes Fragment. Dies zeigt, daß in HL60-Zellen zwei Isoformen von Fyb/SLAP existieren und das im 840 bp Fragment sieben zusätzliche Basenpaare am Ende des 131 bp langen zusätzlichen Inserts enthalten sind, was zu einem "shift" zurück in das Leseraster von Fyb/SLAP führt. Das 700 bp lange Fragment entspricht dem Carboxyterminus der veröffentlichten Fyb/SLAP Sequenz. Ein Klon, der die Fyb/SLAP cDNA in voller Länge, aber ohne das 138 bp Insert enthält wurde durch RT-PCR kloniert, durch doppelsträngiges Sequenzieren verifiziert (Fyb/SLAP1). Ein Klon, der die längere Splice-Variante in voller Länge enthält, wurde aus dem EST-Klon und dem 840 bp RT-PCR Fragment kloniert (Fyb/SLAP2).

4.8 Klonierung und Expression von GST-Fusionsproteinen von Fyb/SLAP

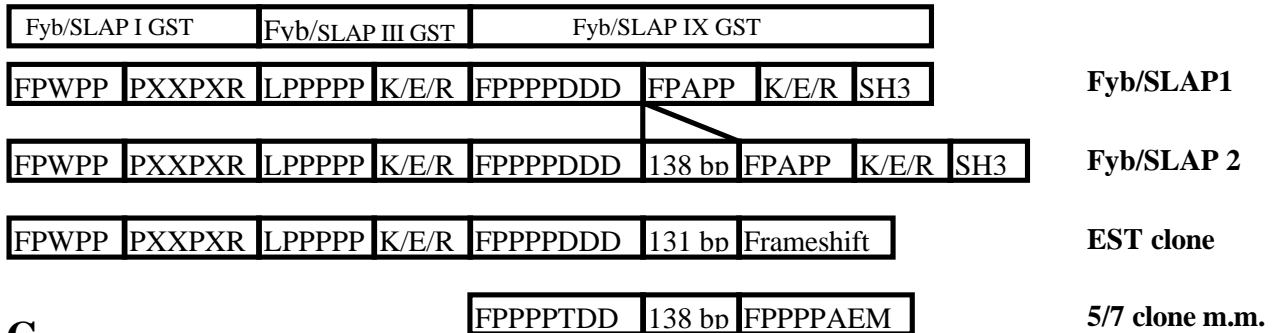
Drei Fragmente von Fyb/SLAP1, welche die Aminosäuren 1-339 (Fyb/SLAP I), 341-598 (Fyb/SLAP III) und 548-783 (Fyb/SLAP IX) kodieren, wurden mit Hilfe der PCR hergestellt und in die Vektoren pGEX-2TK und pGEX-6P1 kloniert. Diese GST-Fusionsproteine wurden exprimiert und an Glutathion-Sephrose (Pharmacia) oder Glutathion-Agarose (Pierce) gereinigt.

A

MAKYNTGGNP TEDVSVNSRP FRVTGPNSSS GIQARKNLFN NQGNASPPAG 50
 PSNVPKFGSP KPPVAVKPSS EEKPDKEKP PFLKPTGAGQ RFGTPASLTT 100
 RDPEAKVGFL KPVGPKPINL PKEDSKPT**FP** **WPP**GNKPSLH SVNQDHDLP 150
 LGPKSGPTTP TSENEQKQAF PKLTGVKGKF MSASQDLEPK PLFPKPAFGQ 200
 KPPLSTENSH EDESPMKNVS SSKGSPAPLG VRSKSGLKP AREDSSENKDH 250
 AGEISSLPFP GVVLPKAASR GGPGLSKNGE EKKEDRKIDA AKNTFQSKIN 300
 QEELASGTPP ARFPKAPSKL TVGGPWGQSQ EKEKGDKNSA TPKQKPLPPL 350
 FTLGPPPPKP NRPPNVDLTK FHKTSSGNST SKGQTSYSTT **SLPPPP**PSHP 400
 ASQPPLPASH PSQPPVPSLP PRNIKPPFDL KSPVNEDNQD GVTHSDGAGN 450
 LDEEQDSEGE T**Y**EDIEASKE REKKREKEEK KRLELEKKEQ KEKEKKEQEI 500
 KKKFKLTGPI QVIHLAKACC DVKGGKNELS FKQGEQIEII RITDNPEGKW 550
 LGRTARGSYG YIKTTAVEID YDSLKLKKDS LGAPSRPIED DQEVYDDVAE 600
 QDDISSHSQS GSGGI**FPPPP** **DDD**IYDGIEE EDADDG***FPAPPKQL**DMGDEV 650
YDDVDTSDFP VSSAEMSQGT NFGKAKTEEK DLKKLKKQEK EEKDFRKKFK 700
~~YDGEIRVLVS TKVTTSTSK KMGTRDLQVK DGEISLEVIQT TDDTKVLCRN~~ 750
EEGKYGYVLR SYLADNDGEI YDDIADGCIY DND 783

*STLQVQEKN TWSWGILKML KGKDDRKSI REKPKVSDSD NNEGSS

B



C

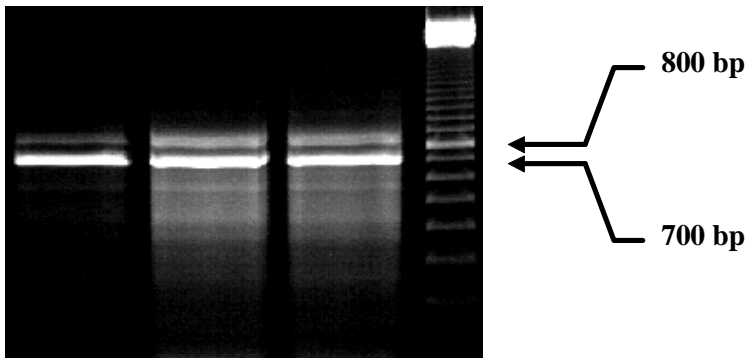


Abbildung 22: Aminosäuresequenz und Motive von Fyb/SLAP. (A) Die Aminosäuresequenz des humanen Fyb/SLAP enthält potentielle Bindungsstellen für SH3-Domänen (unterstrichen), potentielle Bindungsstellen für EVH1-Domänen (fett hervorgehoben), potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen (fett hervorgehoben und unterstrichen) und eine carboxyterminal gelegene SH3-ähnliche Domäne (fett unterstrichen). Die Position des alternativ zusätzlich auftretenden Exons ist durch ein Sternchen markiert. (B) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP1, Fyb/SLAP2, des EST-Klones EST221953, des Partialklones 5/7 aus des Maus und der drei GST-Fusionsproteine (Fyb/SLAP I, III und IX). Gezeigt sind potentielle Motive inklusive der Bindungsstellen der EVH1- und SH3-Domänen (PXXPXR), zwei stark geladene Abschnitte (K/E/R), das 138 bp lange alternative Exon und die carboxyterminale SH3-ähnliche Domäne. (C) Die RT-PCR des Carboxyterminus von Fyb/SLAP aus HL60-Zellen ergibt zwei Banden bei ca. 700 und 840 bp (Spur 1, 2 und 3 sind Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten RT-PCR. Spur 4 zeigt den 100 bp Marker). Dies zeigt, daß in HL60-Zellen zwei Splicevarianten, Fyb/SLAP1 und Fyb/SLAP2 existieren und Fyb/SLAP2 ein zusätzliches Exon von 138 bp einschließt.

4.9 Domänenstruktur und Isoformen von Fyb/SLAP

Fyb/SLAP enthält vier potentielle Bindungsstellen der EVH1-Domäne (siehe **Abbildung 22 B** und **Abbildung 29 C**), welche alle das prolinreiche Kernmotiv F/L/WPPPP enthalten, aber nur bei zwei dieser Motive sind im Anschluß an das Kernmotiv saure Aminosäuren zu finden, die auch essentiell für die Bindung der EVH1-Domäne an sein Bindungsmotiv in ActA (E/DFPPPPXDEE) sind (Niebuhr et al., 1997). Zusätzlich finden sich im Fyb/SLAP-Polypeptid drei potentielle Bindungsstellen der Klasse II für SH3-Domänen und eine potentielle Abl Bindungsstelle der Klasse I für SH3-Domänen (**Abbildung 22 A**) (Sparks et al., 1996) sowie vier Tyrosine (Aminosäuren 462, 595, 651 und 771) die in Motive eingebettet sind, die eine Bindung an SH2-Domänen der Src Kinasen vermitteln könnten (Songyang and Cantley, 1995).

Besonders fallen zwei stark geladene Regionen in der Fyb/SLAP Sequenz auf: Die eine befindet sich aminoterminal (451-504) und die andere carboxyterminal (673-700) zu den letzten beiden potentiellen Bindungsstellen der EVH1-Domänen. Diese Sequenzen könnten potentielle Kernlokalisationssignale sein, noch interessanter aber ist die hohe Ähnlichkeit, die die Sequenz zwischen den Aminosäuren 451-490 mit einer aminoterminalen Sequenz im *L. monocytogenes* Protein ActA hat, welche in die Aktinnukleationsaktivität von ActA involviert ist (**Abbildung 23**) (Pistor et al., 1994, 1995; Lasa et al., 1995, 1997).

Carboxyterminal zu dieser ActA-analogen Sequenz findet sich in Fyb/SLAP eine potentielle G-Aktin Bindungsstelle (aa 566-581) (**Abbildung 23**), deren Sequenz der G-Aktin Bindungsstelle in Thymosin- β 4 (Van Troys et al., 1996), einer Sequenz im Aktin-bindenden Teil des Villin "Kopfes" (Arpin et al.,

1988), einer korrespondierenden Sequenz im Dematin "Kopfstück" (Rana et al., 1993), einer potentiellen G-Aktin Bindungsstelle in Mena (Gertler et al., 1996) und einem Teil der Aktin-bindenden Domäne des Hefe-Proteins Verprolin (Vaduva et al., 1997) ähnelt.

A

iActA 206-GEEAKEKV**EE**GKA**EE**EKN-----NLGQ**EE**ISEARERDLQ**EE**EKMG-245
ActA 46-EKT**EE**QPS**EV**NT-----GPRY**ET**ARE**EV**SSR**DI**KE**EE**KS**N**- 79
Fyb/SLAP 451--LD**EE**QDS**EG**ET**Y**EDIEASKER**EKKREKEE**K**R**LE**EE**EK**KE**-489

B

	Motiv	Referenz
Fyb/SLAP	564-TTAVEIDY DS L K L K DSL-581	In dieser Arbeit
Thymosin β4	4-DMAEIEK F D KS L L K TET-25	Van Troys et al., 1996
Human Villin headpiece	807-AFSALPR WK Q Q N L L K EKG-COOH	Friederich et al., 1992
Chicken Dematin headpiece	364-EFGKLAL W K R N E L K KAS-COOH	Van Troys et al., 1996
Mena	360-LTGLAAA I AGAK L R K VSR-377	Gertler et al., 1996
Yeast Verprolin	32-DALLGDIRKGM L L K KAET-49	Vaduva et al., 1997

Abbildung 23: (A) Vergleich der Aminosäuren aus dem Aminoterminus des ActA Proteins von *L. monocytogenes* und des iActA Proteins von *L. ivanovii* mit einer Aminosäuresequenz aus Fyb/SLAP. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt und ähnliche Aminosäuren unterstrichen. Die Aminosäuren in ActA sind numeriert wie in Domann et al. (1992) und in iActA wie in Kreft et al. (1995). (B) Vergleich der G-Aktinbindungsstellen in Thymosin- β 4, Villin, Dematin, Verprolin und einer potentiellen G-Aktin Bindungsstelle in Mena, mit einer Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP. Die für die G-Aktinbindung essentiellen Aminosäuren sind fett gedruckt, ähnliche Aminosäuren unterstrichen.

In der Isoform Fyb/SLAP2 ist eine 138 bp Sequenz zwischen dem FPPPPDDD und dem FPAPPKQLD Motiv inseriert. Diese zusätzlichen 46 stark geladenen Aminosäuren könnten für das Auftreten der 120 und 130 kDa großen Doppelbande, die in Western Blots von HL60 Zellextrakten gefunden wird, verantwortlich sein (Da Silva et al., 1997 b).

4.10 Herstellung, Affinitätsreinigung und Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen Fyb/SLAP

Um Fyb/SLAP biochemisch und immunocytochemisch zu charakterisieren, wurde ein polyklonales Antiserum gegen den mittleren Teil des Proteins (Fyb/SLAP III GST, **Abbildung 22**) hergestellt, nachdem vom GST-Fusionsprotein das GST mit Thrombin abgespalten wurde. Dieses Antiserum #51 wurde mit Hilfe einer Fyb/SLAP III GST-Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt, die vorher durch chemisches Quervernetzen stabilisiert wurde. Diese affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper (pAk #51) reagieren in Western Blots von Jurkat Zellextrakten spezifisch mit einer Bande von 120 kDa und mit zwei Banden von 120 und 130 kDa in Extrakten von humanen Thrombozyten (siehe **Abbildung 24**). Sie zeigen aber keine Kreuzreaktion mit Extrakten von murinen hämatopoietischen Zelllinien, wie z.B. EL4 T-Zellen oder J774 Makrophagen und mit Extrakten von nicht-hämatopoietischen Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Ein zweites Antiserum (#81) wurde gegen ein Peptid (637-LKGKDDRKKSIREKPKV-682) aus der Sequenz der 46 zusätzlichen Aminosäuren von Fyb/SLAP2 hergestellt und affinitätsgereinigt. Diese polyklonalen Antikörper (pAk #81) reagieren im Western Blot mit der 130 kDa Bande in Extrakten von humanen Thrombozyten (siehe **Abbildung 24**) und zeigen damit, daß die Isoform Fyb/SLAP2 mit den 46 zusätzlichen Aminosäuren für das Auftreten der 130 kDa Bande verantwortlich ist, während die 120 kDa Bande der Fyb/SLAP1 Isoform entspricht.

Zusätzlich reagieren diese polyklonalen Antikörper #81 auch mit einer 130 kDa Bande in einem Western Blot von J774 Maus-Makrophagen Zellextrakten, was zeigt, daß die Isoform Fyb/SLAP2 auch in dieser Zelllinie exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Daraus läßt sich folgern, daß die pAk #51 humanspezifisch sind, während die pAk #81 sowohl die humane, als auch die murine Fyb/SLAP2 Isoform erkennen. Letzteres ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß das Peptid, gegen das der pAk #81 hergestellt wurde, sowohl in der humanen Fyb/SLAP2 Isoform, als auch im murinen Klon 5/7 zu finden ist, der die murine Fyb/SLAP2 Isoform enthält.

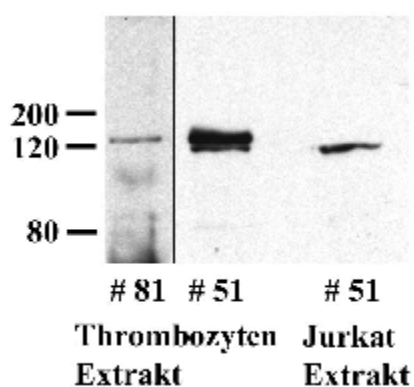


Abbildung 24: Western Blot der polyklonalen, affinitätsgereinigten Antikörper gegen Fyb/SLAP #51 und der Fyb/SLAP2-Isoform spezifischen pAk #81. Spur 1 zeigt die Reaktion des pAk #81 und Spur 2 die Reaktion des pAk #51 auf einem Thrombozyten-Extrakt. Spur 3 entspricht der Reaktion des pAk #51 auf einem Jurkat T-Zell Extrakt.

4.11 Subzelluläre Lokalisation von Fyb/SLAP

Die subzelluläre Verteilung von Fyb/SLAP wurde in hämatopoietischen Zelltypen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

4.11.1 Fyb/SLAP ist in Thrombozyten nur in Lamellipodien lokalisiert

Wenn Thrombozyten in Gegenwart von Ca^{2+} mit Glasoberflächen in Kontakt kommen, beginnen sie zu adhären und sich auszubreiten (Zobel and Woods, 1983; Behnke and Bray, 1988). Die parallel stattfindende Reorganisation des Aktinzytoskeletts bildet hierfür die Grundlage und führt zur Bildung von Filopodien und flachen Lamellipodien (Hartwig, 1992). Die ausgebreiteten Thrombozyten enthalten Aktinfilamentbündeln deren distale Enden den fokalen Kontaktpunkten ähnliche Strukturen ausbilden (Zobel and Woods, 1983; Alexandrova and Vasiliev, 1984).

Fyb/SLAP ist in diesen ausgebreiteten Thrombozyten nur an der Spitze der Lamellipodien lokalisiert. VASP (Reinhard et al., 1992) kolokalisiert mit Fyb/SLAP in Lamellipodien, findet sich aber auch in den fokalen Kontaktpunkten, wo dagegen Fyb/SLAP nicht vorkommt. Zyxin (Beckerle, 1986; Reinhard et al., 1995 b) und Vinculin (für Referenzen siehe Jockusch et al., 1995) finden sich in fokalen Kontaktpunkten, aber nur in wenigen Thrombozyten in den Lamellipodien. Die Verteilung von Fyb/SLAP wurde auch mit der von Phosphotyrosin in den Thrombozyten verglichen. Obwohl Phosphotyrosin in Fibroblasten in fokalen Kontaktpunkten angereichert ist (Maher et al., 1985), kolokalisiert die Phosphotyrosin-Färbung in Thrombozyten mit der von Fyb/SLAP in Lamellipodien und findet sich nicht in den fokalen Kontaktpunkten von Thrombozyten (siehe **Abbildung 25**).

Abbildung 25: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Verteilung von Fyb/SLAP in Thrombozyten. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung von aktivierten, auf Glasdeckgläschen ausgebreiteten Thrombozyten zeigt die Verteilung von Fyb/SLAP (pAk #51) (A-E), VASP (mAk IE273D4) (G), Zyxin (mAk 164D4)(H), Vinculin (mAk hVin1, Sigma) (I), anti-Phosphotyrosin (mAk 4G10, Upstate Biotechnology) (K) und durch Phalloidin nachgewiesenes F-Aktin (F). Die Länge des Balkens entspricht 5 μm .

4.11.2 In Jurkat T-Zellen kolokalisiert Fyb/SLAP mit VASP und F-Aktin

Das Zytoskelett von T-Helfer-Zellen wird, wenn sie durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden, reorganisiert (Stowers et al., 1995). Dies führt zu einer Polarisierung der T-Zellen zu der an sie

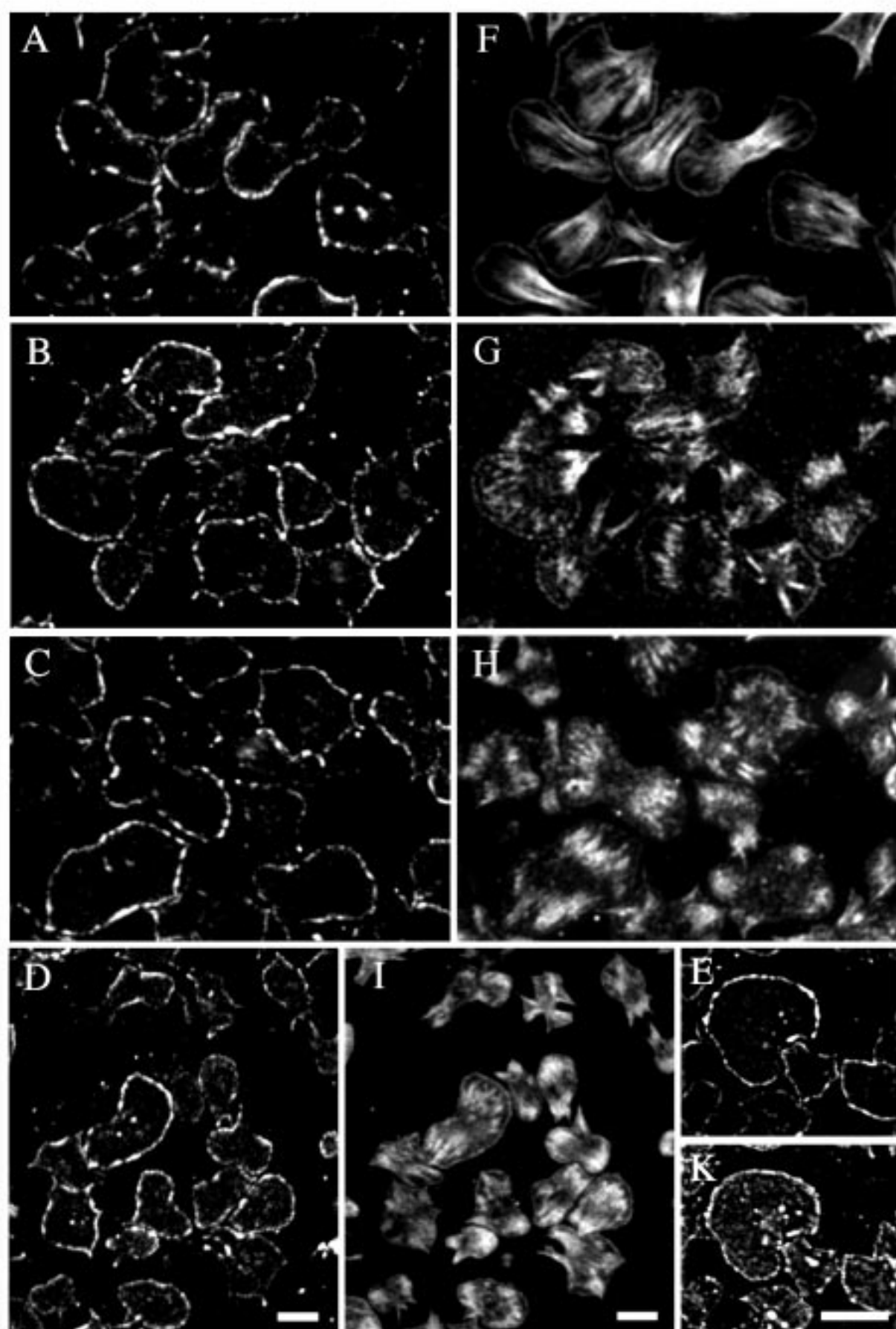


Abbildung 25

gebundenen antigenpräsentierenden Zelle. Ähnlich verhalten sich Jurkat T-Zellen, wenn sie sich an Glasdeckgläschen anheften, die mit anti-CD3 Antikörpern beschichtet wurden, die an einen Teil des T-Zell Rezeptors binden: Sie werden aktiviert und ändern innerhalb von 30 min ihre Zellform, wobei dies durch die Reorganisation ihres Aktinzytoskeletts bewirkt wird. Bei T-Zellen, die fünf Minuten an den mit anti-CD3 Antikörpern beschichteten Glasdeckgläschen angeheftet sind, wird das F-Aktin in einem dichten Ring polarisiert, der die äußere Kante der Zelle auskleidet. Zwischen 15 und 60 Minuten wird dieser Aktinring durch zahlreiche verzweigte, F-Aktin reiche Pseudopodien ersetzt (Parsey and Lewis, 1993). Fyb/SLAP und VASP kolokalisieren mit diesen Aktin-reichen Strukturen direkt unter der Plasmamembran (**Abbildung 26**). Interessanterweise kolokalisiert auch Vav, ein Guaninnukleotid Austauschfaktor für Rho GTPasen (Olson et al., 1996) mit diesen Strukturen (**Abbildung 27**).

Abbildung 26: Subzelluläre Verteilung von Fyb/SLAP in Jurkat T-Zellen: Jurkat T-Zellen wurden für 2 (A, E), 5 (B, F), 15 (C, G, I, K) und 30 (D, H) Minuten mit anti-CD3 Antikörpern (mAk TR66) beschichteten Deckgläschen inkubiert. Diese Doppelimmunfluoreszenzen zeigen eine Färbung mit anti-Fyb/SLAP pAk #51 (A - D, I), anti-VASP mAk (IE 273D4) (E-H) und die mit Phalloidin markierte F-Aktin Verteilung (K). Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

Abbildung 27: Subzelluläre Verteilung von Fyb/SLAP in Jurkat T-Zellen: Jurkat T-Zellen wurden für 2 (A, E), 5 (B, F), 15 (C, G, I, K) und 30 (D, H) Minuten mit anti-CD3 Antikörpern (mAk TR66) beschichteten Deckgläschen inkubiert. Diese Doppelimmunfluoreszenzen zeigen eine Färbung mit anti-Fyb/SLAP pAk #51 (A - D), anti-Vav mAk (E-H). Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

4.11.3 Fyb/SLAP kolokalisiert mit F-Aktin, Evl und WASP an der Kontaktstelle zwischen anti-CD3 beschichteten Beads und Jurkat T-Zellen

Wenn eine T-Zelle an eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) bindet, wird ihr Zytoskelett sehr schnell polarisiert, wobei am Rand der Kontaktstelle Aktin polymerisiert und das Mikrotubuli-organisierende Zentrum zur APC hin ausgerichtet wird (Geiger et al., 1982; Ryser et al., 1982). Werden anti-CD3 Antikörper an Latexbeads (= Kügelchen aus Latex) gekoppelt und diese mit Jurkat T-Zellen inkubiert, reorganisieren die T-Zellen ihr Aktinzytoskelett, so daß man eine große Ansammlung von F-Aktin an der Kontaktstelle zwischen Bead und T-Zelle beobachten kann. Auf diese Weise kann in einem einfachen System die T-Zell Rezeptor vermittelte Interaktion zwischen T-Zellen und "künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen" (Latexbeads) untersucht werden (Lowin-Kropf et al., 1998) (siehe **Abbildung 28 A-E**). Dazu werden Latexbeads mit einem Durchmesser von 4,5 µm mit anti-CD3 Antikörpern beschichtet und zusammen mit Jurkat T-Zellen 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend läßt man die Konjugate aus T-Zellen und Beads auf Glasdeckgläschen adherieren, die mit

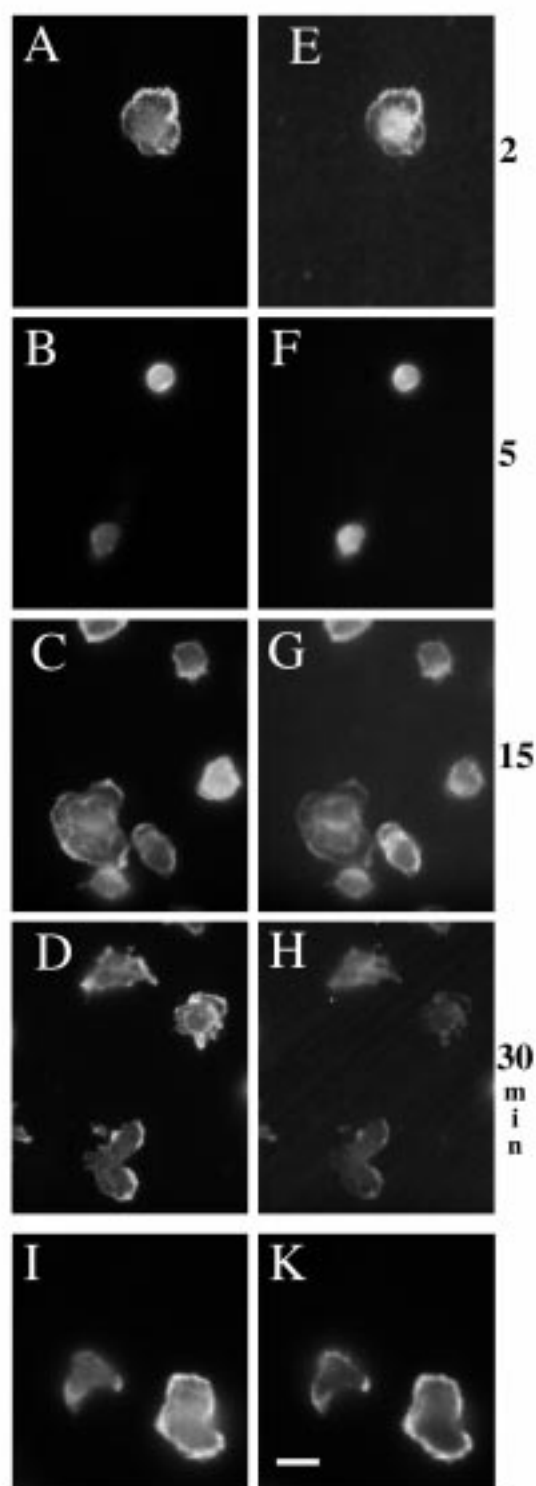


Abbildung 26

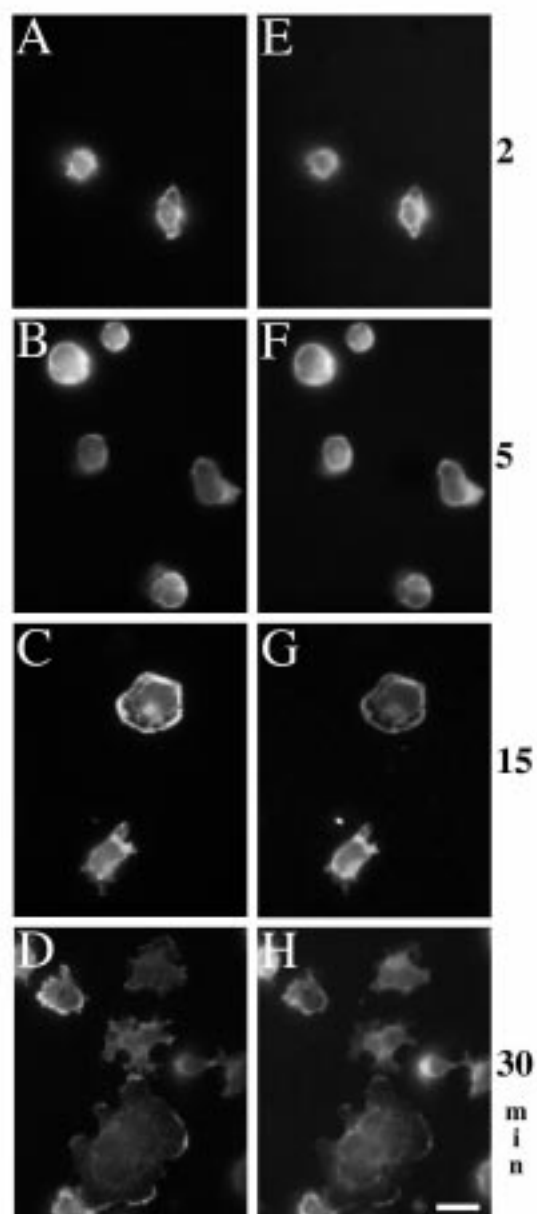


Abbildung 27

Poly-L-Lysin beschichtet wurden und fixiert mit Paraformaldehyd. Auf diese Weise erhält man Präparate, die man mit Standardmethoden der Immunfluoreszenzmikroskopie untersuchen kann.

An der Kontaktstelle kolokalisieren Fyb/SLAP (F), Evl (G) und WASP (H) mit dem neu polymerisierten F-Aktin. Zyxin (I) und Vinculin (K) lassen sich unter diesen Bedingungen aber nicht an der Kontaktstelle nachweisen (siehe **Abbildung 28**).

Abbildung 28: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat T-Zellen, die durch anti-CD3 beschichtete Beads aktiviert werden. F-Aktin ist durch Cy3 markiertes Phalloidin sichtbar gemacht (A-E) und wird mit der Lokalisation von Fyb/SLAP (F), Evl (G), WASP (H), Zyxin (I) und Vinculin (K) verglichen. Die Länge des Balkens entspricht 5 µm.

4.12 Fyb/SLAP ist ein neuer Bindungspartner der EVH1-Domäne

Da die Sequenz von Fyb/SLAP vier potentielle Bindungsstellen der EVH1-Domäne enthält, die eine starke Ähnlichkeit mit dem Kernmotiv der EVH1-Bindungsstelle im ActA aufweisen (E/DFPPPPXDEE) (Niebuhr et al., 1997), war es wahrscheinlich, daß Fyb/SLAP an VASP und Mena über deren EVH1-Domänen bindet.

Durch die Inkubation eines Western Blot (Blot-Overlay Assay) mit einem radioaktiv-markierten Protein können bestimmte Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden, die keine intakte Faltung des auf der Blotmembran immobilisierten Bindungspartners voraussetzen. Da die Bindung der EVH1-Domäne an seinen Liganden von ihrer intakten Faltung abhängig ist (Carl et al., submitted), aber als Ligand eine kurze lineare Aminosäuresequenz ausreicht (Niebuhr et al., 1997), wurden drei Fyb/SLAP GST-Fusionsproteine elektrophoretisch im SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und unspezifische Bindungsstellen mit Blockmedium abgesättigt. VASP und Mena wurden radioaktiv markiert, indem sie in einem Lysat aus Retikulozyten, dem [³⁵S]-markiertes Methionin zugesetzt war, *in vitro* translatiert wurden. Nach Inkubation mit diesem [³⁵S]-markiertem VASP wurde die Membran in Gegenwart von Detergenzien gewaschen und gebundenes VASP mit einem Phosphorimager® durch Autoradiographie nachgewiesen.

Wie in **Abbildung 29 B** zu sehen ist, wurde dabei selektiv der Carboxyterminus von Fyb/SLAP (Fyb/SLAP IX GST, **Abbildung 22 B**) aber nicht der mittleren Teil (Fyb/SLAP III GST, **Abbildung 22 B**) und der Aminoterminal (Fyb/SLAP I GST, **Abbildung 22 B**) von VASP gebunden.

Die gleichen Ergebnisse wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Mena erhalten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen *in vitro*, daß es sich um eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen Fyb/SLAP und VASP bzw. Mena handelt. Weiterhin bedeutet es, daß die ersten beiden potentiellen Bindungsstellen der EVH1-Domäne, die im GST-Fusionsprotein (Fyb/SLAP I GST, **Abbildung 22 B**) bzw. (Fyb/SLAP III GST, **Abbildung 22 B**) liegen keine realen Bindungsstellen der EVH1-Domäne sind. Da im GST-Fusionsprotein, der den Carboxyterminus von Fyb/SLAP abdeckt (Fyb/SLAP IX GST, **Abbildung 22 B**), die beiden anderen potentiellen Bindungsstellen der EVH1-

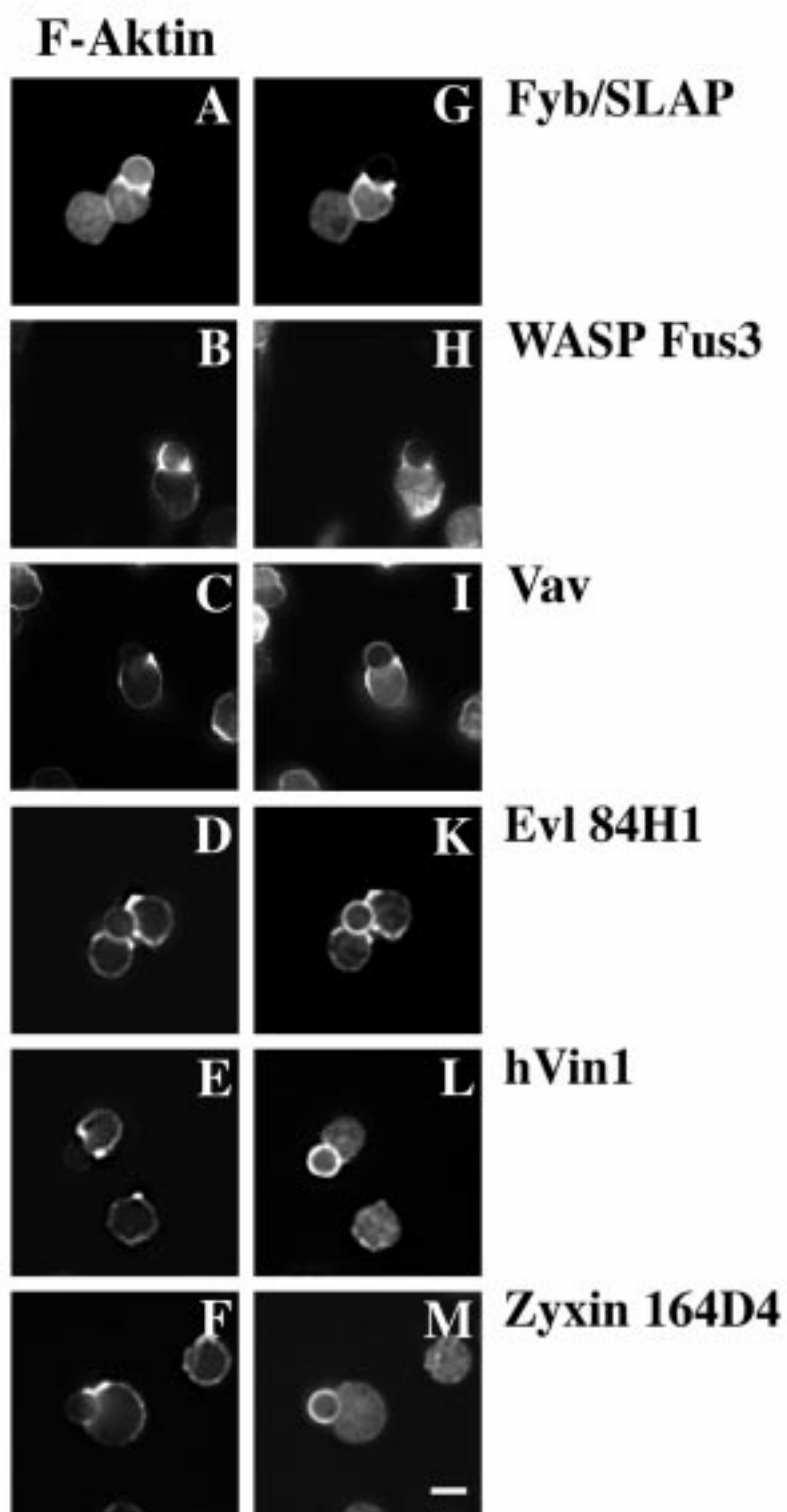


Abbildung 28

Domäne enthalten sind, kann deshalb keine Aussage darüber gemacht werden, ob beide reale Bindungsstellen sind.

4.13 VASP ist mit Fyb/SLAP in hämatopoietischen Zellen *in vivo* assoziiert

Um diese *in vitro* Ergebnisse zu überprüfen, wurde eine Koimmunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes VASP (IE 226C2) durchgeführt. Dazu wurden Zellysate aktivierter Jurkat T-Zellen mit den VASP-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit Agarose, an die Antikörper gekoppelt waren, die spezifisch murine IgG-Antikörper erkennen, isoliert und die Agarose in Gegenwart von Detergenzien gewaschen. Proteine, die spezifisch in den Immunkomplexen gebunden waren, wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit VASP-spezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt) und den affinitätsgereinigten Fyb/SLAP-spezifischen polyklonalen Antikörpern (pAk #51) untersucht (siehe **Abbildung 29 A**). Die VASP-spezifischen Antikörper können VASP und Fyb/SLAP aus Lysaten von aktivierten Jurkat T-Zellen koimmunpräzipitieren. Dieses Ergebnis zeigt, daß VASP mit Fyb/SLAP in hämatopoietischen Zellen *in vivo* assoziiert ist.

4.14 Bestimmung der VASP- und Mena-Bindungsstelle in Fyb/SLAP

Da mit dem Blot-Overlay Assay (siehe **4.12**) nur gezeigt werden konnte, daß VASP und Mena direkt an den Carboxyterminus von Fyb/SLAP binden, sollte jetzt die direkte Bindungsstelle analysiert werden. Dazu wurde ein Peptid-Scan der Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP verwendet, der von der Arbeitsgruppe von Dr. Ronald Frank (Abteilung Molekulare Erkennung, GBF, Braunschweig) freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Peptid-Scan deckt die ganze Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP mit synthetischen Peptiden von 15 Aminosäuren Länge ab, die sich jeweils in 12 Aminosäuren überschneiden (siehe auch **4.1.1**).

Dieser Fyb/SLAP Peptid-Scan wurde nun analog zum Blot-Overlay Assay mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VASP bzw. Mena inkubiert, in Gegenwart von Detergenzien gewaschen und gebundenes VASP bzw. Mena mit einem Phosphorimager® durch Autoradiographie nachgewiesen (siehe auch **4.12**).

Wie in **Abbildung 29 C** zu sehen ist, werden von VASP und Mena (Daten nicht gezeigt) auf dem Peptid-Scan der Fyb/SLAP1 Sequenz drei und auf dem Abschnitt des Peptid-Scans, der den unterschiedlichen Carboxyterminus von Fyb/SLAP2 repräsentiert, zwei aufeinanderfolgende Spots erkannt. Die synthetischen Peptide dieser Spots entsprechen alle der dritten potentiellen Bindungsstelle der EVH1-Domäne (siehe **Abbildung 29 C**), wodurch gezeigt werden konnte, daß es die Bindungsstelle von VASP und Mena in Fyb/SLAP ist.

Da mehrere aufeinanderfolgende Spots in dem Peptid-Scan von VASP und Mena erkannt wurden, läßt sich dadurch das für die Bindung minimal nötige Peptid auf die Aminosäuresequenz 616-624 von

Fyb/SLAP (616-FPPPPDDDI-624) eingrenzen. Dieses Bindungsmotiv stimmt sehr gut mit dem Konsensusmotiv überein, das für die Bindung von EVH1-Domänen bestimmt wurde (Niebuhr et al., 1997).

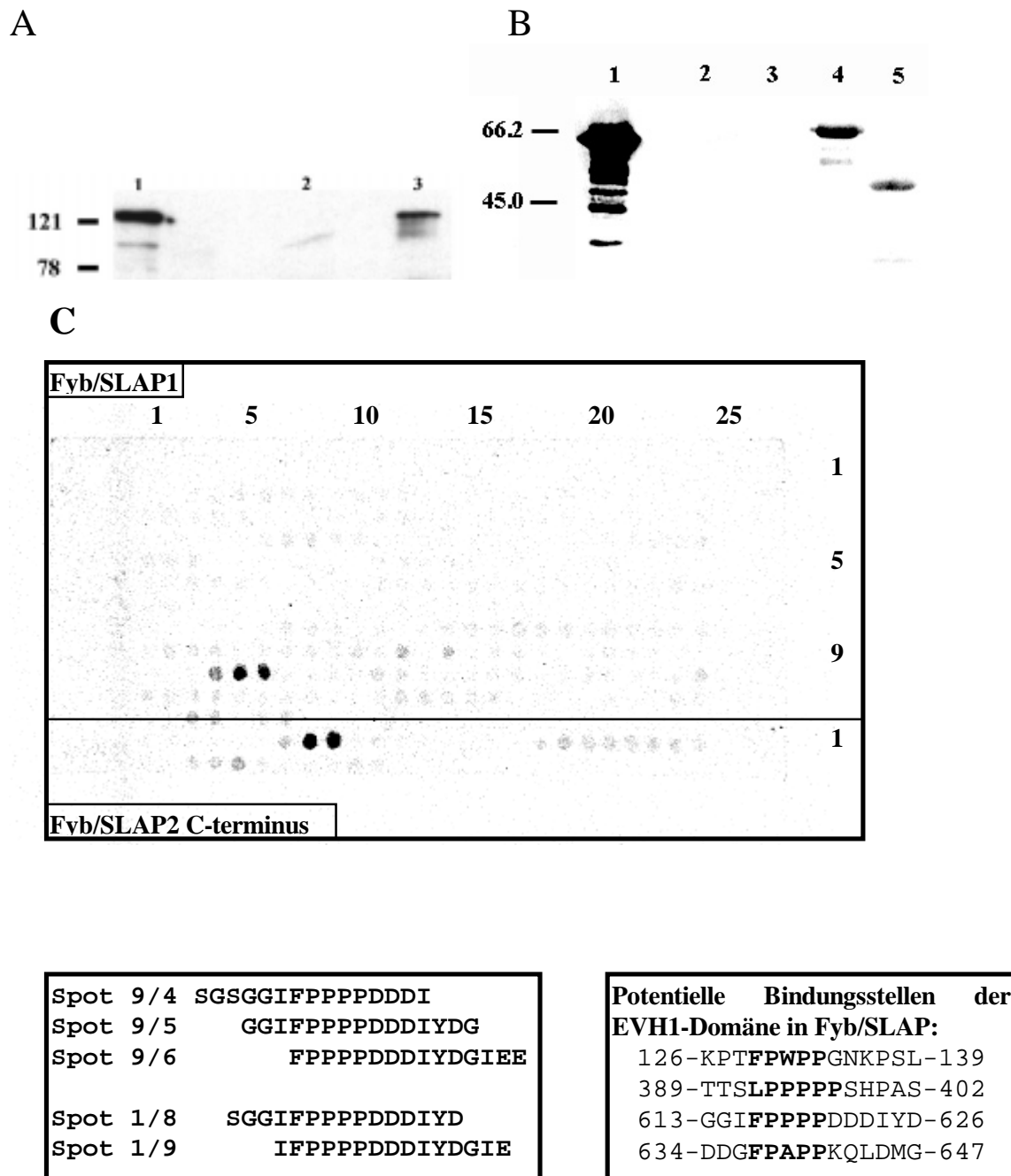


Abbildung 29: (A) Koimmunpräzipitation von VASP und Fyb/SLAP aus Jurkat T-Zell Lysaten mit VASP-spezifischen monoklonalen Antikörpern (IE 226C2). Gezeigt ist ein Western Blot mit anti-Fyb/SLAP Antikörpern (pAk #51). Spur 1: Jurkat T-Zell Lysat als Positivkontrolle. Spur 2: Kontrollimmunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein bakterielles Protein. Spur 3: Immunpräzipitation mit monoklonalen anti-VASP Antikörpern.

(B) Blot-Overlay Assay mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VASP auf GST-Fusionsproteinen von Fyb/SLAP und dem 5/7 Partialklon (siehe auch Abbildung 22 B). Spur 1: GST-Fusionsprotein der prolinreichen "Repeats" aus dem ActA als Positivkontrolle. Spur 2: Fyb/SLAP I GST. Spur 3: Fyb/SLAP II GST. Spur 4: Fyb/SLAP IX GST. Spur 5: GST Fusionsprotein des Partialklons 5/7.

(C) **Bestimmung der VASP-Bindungsstelle in der Fyb/SLAP Aminosäuresequenz.** Der Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP1 und dem Carboxy-terminus von Fyb/SLAP2 entsprechende immobilisierte, je 15 Aminosäuren lange Peptide, die sich jeweils um zwölf Aminosäuren in der Sequenz überschneiden, wurden auf einer derivatisierten Zellulosemembran synthetisiert. Dieser Peptid-Scan wurde mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VASP inkubiert und auf einem Phosphorimager ausgewertet. Die Peptidsequenzen der positiven Spots und die Aminosäuresequenzen der vier potentiellen Bindungsstellen der EVH1-Domänen sind unten gezeigt.

4.15 Die SH3-Domäne von Fyb/SLAP bindet an die c-Abl Tyrosinkinase

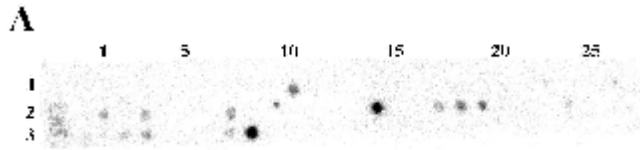
Aufgrund von Computeranalysen der Fyb/SLAP-Aminosäuresequenz wurde postuliert, daß der Carboxyterminus von Fyb/SLAP eine SH3-ähnliche Domäne enthält (Da Silva et al., 1997 b). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Blot-Overlay Assay mit dem Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein, welches die SH3-ähnliche Domäne einschließt, auf einem Peptid-Scan durchgeführt (**Abbildung 30 A**). Zwischen dem GST und dem Fyb/SLAP-Fragment befindet sich in allen GST-Fusionsproteinen, die mit dem pGEX-2TK-Vektor (Pharmacia) hergestellt wurden, eine kurze Aminosäuresequenz, die von der Protein Kinase A spezifisch phosphoryliert werden kann. Durch eine Phosphorylierung mit [³²P]-ATP wurde das Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein an einer Glutathion-Sepharosematrix radioaktiv markiert, das restliche [³²P]-ATP durch Waschen entfernt und das markierte Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion eluiert. Die durchgeführte radioaktive Markierung des Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein wurde überprüft, indem ein Aliquot elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE) und durch Autoradiographie nachgewiesen wurde. Dieses radioaktiv markierte Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein wurde nun mit einem Peptid-Scan inkubiert, auf dem bekannte Liganden der Klasse I und II von verschiedenen SH3-Domänen und als Kontrolle ebenfalls prolinreiche Liganden der WW/WWP- und EVH1-Domänen repräsentiert waren (siehe **Abbildung 30 B**). Ein analoger Peptidscan ist auch von Niebuhr et al. (1997) verwendet worden, um die Spezifität der EVH1-Domäne zu untersuchen (Niebuhr et al., 1997). Nach dem Waschen des Peptidscans in Gegenwart von Detergenzien, wurde er mit einem Phosphorimager® durch Autoradiographie ausgewertet.

Der Carboxyterminus von Fyb/SLAP bindet an die SH3-Liganden in c-Abl, Dynamin, der p85 Untereinheit der PI(3)-Kinase, hnRNP K. Weiterhin bindet er an ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die in Phage display-Bibliotheken als Konsensusmotiv der SH3-Domäne von Grb2 N gefunden wurde (Sparks et al., 1996) (**Abbildung 30 B**).

Da alle von dem Carboxyterminus von Fyb/SLAP gebundenen Peptide SH3-Bindungsstellen sind und die ebenfalls prolinreichen Liganden der WW/WWP und EVH1-Domänen nicht gebunden wurden, kann man daraus schließen, daß der Carboxyterminus von Fyb/SLAP eine funktionelle SH3-Domäne enthält. Alle diese Bindungsstellen repräsentieren SH3-Bindungsstellen der Klasse II und die Bindung ist

spezifisch, da andere SH3-Bindungsstellen der Klasse II oder der Klasse I nicht Liganden dieser carboxyterminal gelegenen SH3-Domäne von Fyb/SLAP sind.

Dieses Ergebnis wurde durch ein Bindungs-Assay mit Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein und Jurkat T-Zell-Lysaten bestätigt. Dazu wurde Fyb/SLAP IX GST an Glutathion-Agarose gebunden und parallel mit GST-Agarose als Negativkontrolle mit Jurkat T-Zell Lysaten inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden gebundene Proteine im Western Blot mit monoklonalen anti c-Abl, anti-Dynamin und Antikörpern gegen die p85 Untereinheit der PI(3)-Kinase analysiert. Tatsächlich wird c-Abl von dem Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein (**Abbildung 30 C**) gebunden, während Dynamin und die p85 Untereinheit der PI(3)-Kinase damit nicht interagiert.

A**B**

1	Abl	PPWWAPPPIPNSPQVL	Src	GPPPVPSRPN	Grb2 N	WLPRPIPKVPVS
	Cortactin	PTYPPPPPD TAKGA		RAPPGVPSRSG		LQAPLPTKTR
		LTPQSKPPLPPKPSAV		PLPPPPPRGG		AVSPLLPRKER
		LGEFSKPPIPQKPTWM		APPPPVPRGR		KTAPTTPKRSS
5	Grb2 N	KWDSLPLPALPPAFTVE	ActA	SFEFPPPTDEELRL		ASLPPVPPRLD
		YWDMLPRLPGEEP SL		AVPPPVPPPS		GGAPPVPSRPG
		YYQRPLPPLPLSHFES		QPAPALPPKPP		GPPPVPSRPN
		YFSRALPGLPERQEAH		GGPPPGPGRRG		RAPPGVPSRSG
		SLWDPLPPIQSKTSV		TKSPPQPPRPD		PVPPVPPRRR
10		DPYDALPETPSMKASQ	Yes	PVKQPPPLAPQS		DSPPAIPPRQP
	p53bp2	SSAPQRPLPVRKSRP	Abl	RAPTMPPPLPPV		ESPLLPPREP
	ActA	VVPLGRPEIPLRKS LP		YPPAYPPPPVPV		IAGPPVPPRQS
	Plcγ	SFEFPPPTDEELRL	Plcγ	PGPGYGGPPVPP		NLPEPAPRPS
15		MPPPVPPRPPGTLQVA		APPVPSRPGASP		PPGPAGPIRQA
	Crk N	VPPLVAPRPPSTLNSL		PPQVPSRPNRNR	WBP-1	HHPGTPPPPYTVGP
		GQPAGDPDPPPLPAKF		LPPVPPRLDLLP	ActA	G
	Src	ATSEGLPILPSKVGSY	Crk N	QAPLPTKTR	WBP-2	SFEFPPPTDEELR
		PPQMPLPEIPQQ		VSPLLPRKER		L
20		PPDNGPPPLPTS		EKPALPRKRA	WWP / SH3	MYVQPPPPYPGPM
		TAPKPMPPRPPL		PPPALPPKKR		E
						MPTSQPPPPYPPE
						D
						APPTPPPLPP
						APPAPPPLPP
25		SRARNLPLPPPP	ActA	TPPALPEKKR		
		TVTRGVPPPPPTV		KPPPLPEKKN		
		RPPRPLPVAPGS		SFEFPPPTDEELRL		
		VRKQMLPPPPCP		PPPALPPKQR		
		GGAPPVPSRPG	Grb2 N	PQRRPLPCTPGD		

C

Abbildung 30: Spezifische Bindung der Fyb/SLAP SH3-Domäne an SH3-Liganden. (A) Peptide, die publizierten SH3, WW/WWP und ActA EVH1-Liganden entsprechen, wurden als Peptid-Scan auf Whatman Papier synthetisiert, mit ^{32}P -markiertem Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein, das die potentielle SH3-Domäne von Fyb/SLAP einschließt, inkubiert und mit einem Phosphorimager® ausgewertet.

(B) Gezeigt werden die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide: positive Sequenzen sind fett gedruckt. Die Positionen 1-17 in Spalte 1 entsprechen SH3-Liganden, die in Phage Display Bibliotheken identifiziert wurden (zwei Beispiele für jedes Konsensusmotiv; Sparks et al., 1996). Die Positionen 18 in Spalte 1 bis Position 13 in Spalte 3 entsprechen Peptidsequenzen, die als SH3-Bindungsstellen in Proteinen identifiziert wurden (Sparks et al., 1996). Mögliche Liganden von

WW/WWP-Domänen finden sich in Spalte 3 (Position 14, 16 und 17; Chen and Sudol, 1995) und zusätzlich Motive, die sowohl als Bindungsstelle für WW/WWP als auch SH3 Domänen gefunden wurden (Spur 3, Positionen 18 und 19; Chan et al., 1996).

(C) Bindungs-Assay mit der SH3-Domäne von Fyb/SLAP. Das Fyb/SLAP IX GST-Fusionsprotein, das die SH3-Domäne von Fyb/SLAP einschließt, wurde mit Jurkat T-Zell-Lysaten inkubiert. Gebundene Proteine wurden in einem Western Blot mit c-Abl-spezifischen monoklonalen Antikörpern ausgewertet. GST-Agarose vor (Spur 1) und nach (Spur 2) der Inkubation mit den Jurkat T-Zell-Lysaten als Negativkontrolle. Fyb/SLAP IX GST-Agarose vor (Spur 3) und nach (Spur 4) der Inkubation mit den Zell-Lysaten. Spur 5: Ein Aliquot des Jurkat T-Zell-Lysates dient als Positivkontrolle.

4.16 Proteine der Ena/VASP Familie sind ein wichtiger Faktor für die Aktinreorganisation in T-Zellen

Da Fyb/SLAP in aktivierten Jurkat T-Zellen durch Fyn und das Adapterprotein SLP-76 in einen Komplex am T-Zell Rezeptor rekrutiert wird und da mit der T-Zell Aktivierung eine umfangreiche Reorganisation des Aktinzytoskeletts einhergeht, stellte sich die Frage, ob die Rekrutierung von Proteinen der Ena/VASP-Familie in diesen Komplex an dieser Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist.

Die Mikroinjektion eines Peptids der Bindungsstelle der EVH1-Domäne im ActA (SEFSSFEFPPPPTDEELRLA) führt zur Delokalisation von VASP (Pistor et al., 1995) und Mena (Gertler et al., 1996) aus fokalen Kontaktpunkten, während ein damit nicht verwandtes Peptid aus der ActA-Sequenz darauf keinen Effekt hat.

Um den Effekt der Delokalisation der Ena/VASP-Proteine während der Reorganisation des Aktinzytoskeletts in T-Zellen untersuchen zu können, wurden die vier in der ActA-Sequenz hintereinander liegenden Bindungsstellen der EVH1-Domäne an den Aminoterminus der GFP-cDNA kloniert (siehe **Abbildung 31 GFP-ActA5**).

In unserer Arbeitsgruppe hatte Frau Dr. Susanne Pistor alle vier Bindungsstellen für die EVH1-Domäne in der ActA Proteinsequenz durch Punktmutationen inaktiviert. Dies wurde durch eine Mutation der Aminosäure Phenylalanin zu Alanin bewerkstelligt, die sich am Anfang der Kernsequenz der Bindungsstelle der EVH1-Domäne befindet und eine wichtige Voraussetzung für die Bindung dieser Domäne an das ActA Protein ist (Niebuhr et al., 1997). Um eine gute Kontrolle zu erhalten wurde die cDNA dieser ActA Mutante analog zum GFP-ActA5 Konstrukt kloniert (siehe **Abbildung 31 GFP-ActA5 F→A**).

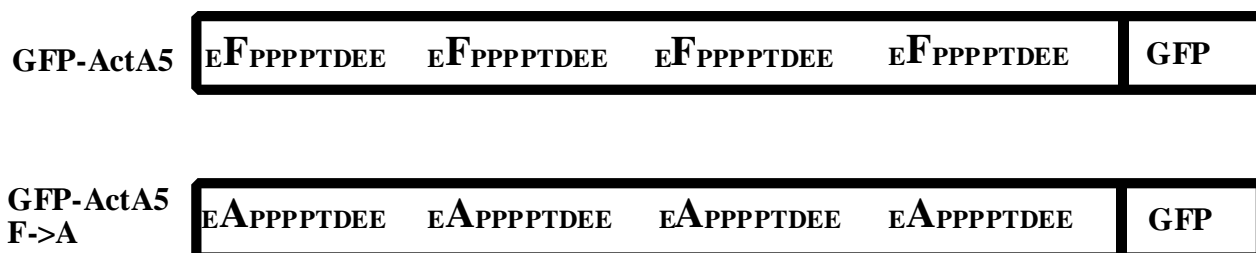


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Konstrukte GFP-ActA 5 und der Mutante in der Bindungsstelle der EVH1-Domäne, GFP-ActA 5 F→A.

Um die Funktion dieser Konstrukte zu überprüfen wurden sie in HeLa-Zellen transfiziert, diese nach 24 Stunden fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper (IE60D4 anti-VASP) gegen VASP angefärbt. VASP findet sich in Zellen, in denen das GFP-ActA5 Konstrukt exprimiert wird nicht mehr in den fokalen Kontaktpunkten, während es in Zellen in denen das Kontrollkonstrukt GFP-ActA5 F→A exprimiert wird noch dort lokalisiert ist (siehe **Abbildung 32**). Dies zeigt, daß die Expression des GFP-ActA5 Konstruktes zur Delokalisation der Proteine der Ena/VASP Familie führt, während das Kontrollplasmid keinen Einfluß auf deren Lokalisation hat.

Diese beiden Konstrukte wurden nun verwendet, um den Einfluß der Proteine der Ena/VASP-Familie auf die Aktinreorganisation während der T-Zell Aktivierung zu untersuchen. Jurkat T-Zellen, die mit dem GFP-ActA5 Konstrukt transfiziert sind, binden zwar noch an die anti-CD3 beschichteten Beads, können ihr Aktinzytoskelett aber nicht mehr reorganisieren. Dies führt dazu, daß an der Kontaktfläche zwischen den Beads und den T-Zellen keine massive F-Aktin Ansammlung beobachtet werden kann, wie dies in nicht-transfizierten Zellen der Fall ist (siehe **Abbildung 32 F, I**). Jurkat T-Zellen, die mit dem GFP-ActA5 F→A Kontrollplasmid transfiziert wurden, können dagegen ihr Aktin-Zytoskelett wie nicht transfizierte T-Zellen reorganisieren, was zur Polymerisation von F-Aktin an der Bead/T-Zell Kontaktfläche führt (siehe **Abbildung 32 G, K**).

Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß eine Interaktion zwischen Proteinen der Ena/VASP-Familie und Proteinen, die das Bindungsmotiv der EVH1-Domäne enthalten, für die Aktinreorganisation während der T-Zell Aktivierung von entscheidender Bedeutung ist.

Abbildung 32: Transfektion von HeLa Zellen mit (A, C) GFP-ActA5 und (B, D) GFP-ActA5 F→A. In (A) und (B) sind die Zellen mit dem monoklonalen anti-VASP Antikörper 60D4 angefärbt. In C und D erkennt man die transfizierten Zellen an der GFP-Markierung. Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

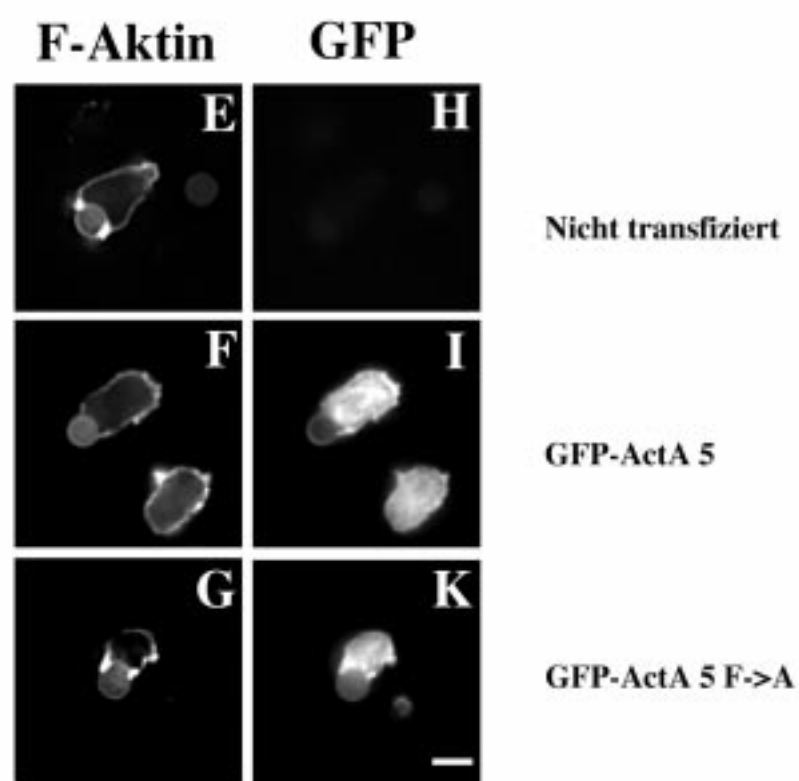
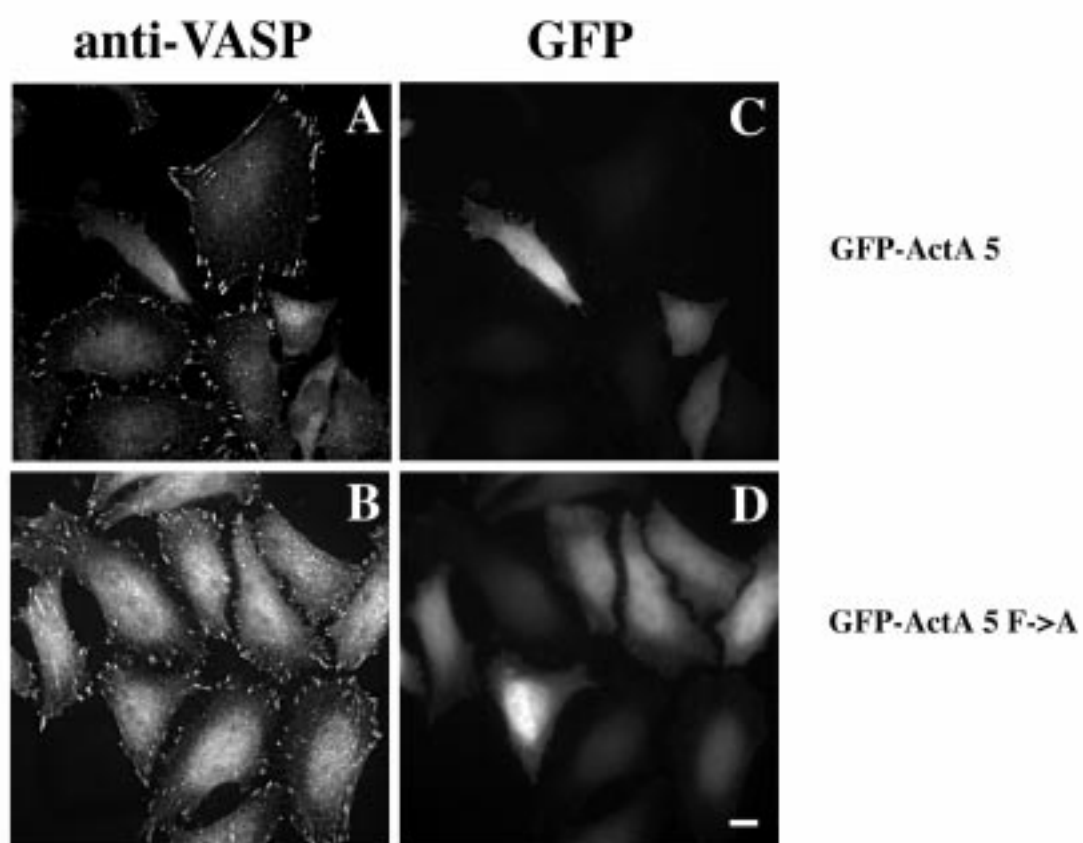


Abbildung 32

Transfektion von Jurkat T-Zellen mit GFP-ActA5 (F, I) und GFP-ActA5 F→A (G, K). Eine nicht-transfizierte Zelle ist zum Vergleich in (E, H) abgebildet. In E-G ist F-Aktin mit Cy3-Phalloidin sichtbar gemacht und H-K zeigt durch die GFP-Fluoreszenz, ob die Zellen transfiziert sind. Die Länge des Balkens entspricht 5 µm.

4.17 Fyb/SLAP befindet sich in aktivierten T-Zellen in einem Komplex mit WASP

In der Immunfluoreszenz kolokalisiert Fyb/SLAP an der Kontaktfläche zwischen aktivierten Jurkat T-Zellen und mit anti-CD3 Antikörpern beschichteten Beads mit WASP und einer massiven F-Aktin Ansammlung (siehe **Abbildung 28**).

Daher ließ sich vermuten, daß Fyb/SLAP und WASP während der T-Zell-Aktivierung in einen Komplex am T-Zell Rezeptor zusammengebracht werden. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde mit einem polyklonalen Antiserum gegen WASP (Fus3, Symons et al., 1996), das dafür freundlicherweise von Dr. Jonathan Derry (Immunex Corp., Seattle, Washington, USA) zur Verfügung gestellt wurde, eine Immunpräzipitation aus Extrakten von aktivierten Jurkat T-Zellen durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden mit Protein A-Sepharose isoliert und die Sepharose in Gegenwart von Detergenzien gewaschen. Proteine, die spezifisch in den Immunkomplexen gebunden waren, wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit den affinitätsgereinigten Fyb/SLAP-spezifischen polyklonalen Antikörpern (pAk #51) untersucht. Das Ergebnis mehrerer Immunpräzipitationen ist eindeutig, die Bedingungen werden aber zur Zeit noch optimiert, um einen geringeren Hintergrund zu erhalten.

Das WASP-spezifische Antiserum kann WASP und Fyb/SLAP aus Lysaten von aktivierten Jurkat T-Zellen koimmunpräzipitieren. Dieses Ergebnis zeigt, daß WASP mit Fyb/SLAP in hämatopoietischen Zellen *in vivo* in einem Komplex vorliegt.

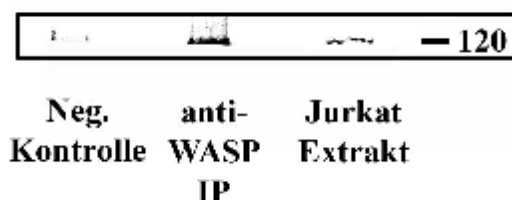


Abbildung 33: Koimmunpräzipitation von Fyb/SLAP mit einem Antiserum gegen WASP (Fus3). Ein Lysat aktivierter Jurkat T-Zellen wurde mit dem WASP-Antiserum inkubiert, die Immunkomplexe mit Protein A-Sepharose isoliert, die Präzipitate auf einem SDS-Gel aufgetrennt

und im Western Blot mit den polyklonalen anti-Fyb/SLAP Antikörpern (pAk #51) analysiert. In Spur 1 ist die Kontrollimmunpräzipitation mit Kaninchen IgG als Negativkontrolle, in Spur 2 die Immunpräzipitation mit WASP-Antiserum und in Spur 3 ein Aliquot des Jurkat Lysat als Positivkontrolle gezeigt.

5 Diskussion

5.1 Die Zyxin-spezifischen monoklonalen Antikörper sind wichtige Werkzeuge für die Charakterisierung einer möglichen Funktion von Zyxin in der räumlichen Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Signaltransduktion

Zu Beginn der Arbeit war das humane Zyxin gerade kloniert worden, das in Teilbereichen nur eine geringe Homologie zum schon vorher bekannten Zyxin aus dem Huhn aufwies. Um das humane Zyxin näher zu charakterisieren, wurden monoklonale Antikörper und ein GFP-Fusionsprotein hergestellt.

Mit den Zyxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern wurde die subzelluläre Verteilung in den fokalen Kontaktpunkten und entlang der Stressfasern in einer periodischen Anordnung beobachtet. Dies stimmt mit der subzellulären Verteilung des Hühnerzyxins und der Lokalisation in humanen Zellen überein, die mit dem polyklonalen Antiserum gegen das p83/Zyxin aus dem Schwein detektiert wurde. Die periodischen Anordnung von Zyxin entlang der Stressfasern, die exakt mit der Anordnung von α -Aktinin übereinstimmt, war bisher noch nicht beschrieben worden. Insofern konnte die Koloalisation von Zyxin mit α -Aktinin entlang der Stressfasern bestätigt, aber mit einer höheren Auflösung genauer charakterisiert werden. Das humane Zyxin hat also die gleiche subzelluläre Verteilung, wie das Zyxin aus dem Huhn, trotz ihrer in Teilbereichen nur gering ausgeprägten Homologie.

Bisher war die Dynamik von Zyxin noch nicht in lebenden Zellen untersucht worden. Dies war erstmals mit Hilfe der transienten und stabilen Expression eines Fusionsproteins aus GFP und humanem Zyxin möglich. Hiermit konnte gezeigt werden, daß Zyxin sehr früh in die fokalen Komplexe, die Vorläufer der fokalen Kontaktpunkte, integriert. Weiterhin wurde deutlich, daß sich Zyxin nicht an der Spitze der Lamellipodien befindet, wie dieses nach Färbungen mit dem polyklonalen Antiserum gegen das p83/Zyxin aus dem Schwein (AS83-1) in humanen Hautfibroblasten vermutet wurde (Reinhard et al., 1995 b). Diese Diskrepanz läßt sich dadurch erklären, daß in der Arbeit von Reinhard et al. nur sehr kleine lamellipodiale Bereiche in den untersuchten Hautfibroblasten zu erkennen sind und in der gezeigten Auflösung nicht zwischen der Spitze der Lamelle und Kontakten mit der extrazellulären Matrix direkt hinter der Spitze der Lamellipodien unterschieden werden kann.

Schon 1992 (Reinhard et al., 1992) konnte gezeigt werden, daß man VASP in ausgebreiteten Thrombozyten in Lamellipodien und zusätzlich in den fokalen Kontaktpunkten findet. Der Vergleich der Verteilung von VASP und Zyxin zeigt, daß Zyxin zwar auch in den fokalen Kontaktpunkten, aber nur in wenigen Thrombozyten in den Lamellipodien gefunden wird. Ob

sich diese Lamellipodien von den Lamellipodien in den anderen Thrombozyten unterscheiden, oder ob es sich hierbei um Kontakte der Zelle mit dem Substrat direkt hinter der Spitze des Lamellipodiums handelt, kann in der beobachteten Auflösung nicht entschieden werden.

Die subzelluläre Lokalisation von Zyxin läßt sich wie folgt zusammenfassen: Zyxin findet sich in fokalen Kontaktpunkten und in Stressfasern, wo es in einem periodischen Muster exakt mit α -Aktinin kolokalisiert, nicht aber an der Spitze der Lamellipodien.

Da in Thrombozyten VASP mit Fyb/SLAP aber nicht mit Zyxin und Vinculin in Lamellipodien kolokalisiert, läßt diese Beobachtung vermuten, daß es in nicht-hämatopoietischen Zellen ein Analog des Fyb/SLAP geben sollte, das dort VASP in die Lamellipodien rekrutiert.

Die in dieser Arbeit hergestellten Zyxin-spezifischen monoklonalen Antikörper erkennen Epitope, die in Bereichen der Aminosäuresequenz liegen, die für die Funktion des Proteins wichtig sein könnten. Der Antikörper 164D4 erkennt eine Sequenz, die im potentiellen Kernexportsignal von Zyxin liegt. Diese Aminosäuresequenz und damit auch das Epitop des Antikörpers ist in allen bisher getesteten Spezies konserviert. Dies deutet darauf hin, daß dieser Sequenzabschnitt eine essentielle Bedeutung für die Funktion des Proteins hat. Ob es *in vivo* einen Transport von Zyxin zwischen Zytoplasma und Zellkern gibt und ob Zyxin in beiden Kompartimenten eine Funktion hat, ist zur Zeit unbekannt. Mit beiden Zyxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern und dem GFP-Fusionsprotein wurde während der Charakterisierung unter keinen Bedingungen eine Kernlokalisierung beobachtet. Auch wenn es bei zwei verschiedenen Antikörpern relativ unwahrscheinlich ist, könnten jedoch beide Epitope im Zellkern nicht zugänglich sein. Die Bindungsstellen der Antikörper könnten durch intra- oder intermolekulare Proteinbindungen maskiert werden. Sollte dies der Fall gewesen sein, hätte Zyxin dann aber als GFP-Fusionsprotein im Zellkern detektiert werden können. Die Anwesenheit einer sehr geringen Menge von Zyxin im Zellkern, die unter dem Detektionslimit der hier beschriebenen Methoden liegt, ist aber auch in den untersuchten Zellen möglich. Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß ein Kerntransport in bestimmten Zelltypen unter besonderen Bedingungen, wie zum Beispiel in der Embryonalentwicklung, stattfindet. Daher könnte die Mikroinjektion des Antikörpers 164D4 in den Kern oder das Zytoplasma von Zellen Aufschluß über die *in vivo* Funktion dieses potentiellen Kernexportsignals geben.

Zyxin könnte möglicherweise die Funktion haben, im Zellkern als Transkriptionsfaktor zu wirken oder einen anderen Transkriptionsfaktor zu binden und damit die Genexpression zu regulieren. Zyxin ist dazu möglicherweise in der Lage, da es LIM-Domänen enthält. LIM-Domänen können sowohl Protein-Protein, als auch potentiell Protein-DNA Bindungen eingehen, obwohl letzteres bisher nicht gezeigt werden konnte (Schmeichel and Beckerle, 1994). Andere Proteine mit LIM-Domänen sind an der Kontrolle der Genexpression und der

Zelldifferenzierung beteiligt, wie z.B. die Proteine Lin-11, Isl-1 und Mec-3, deren drei Anfangsbuchstaben der LIM-Domäne den Namen gegeben haben und die als Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielen (Freyd et al., 1990). Auf diese Weise könnte Zyxin als "second messenger" zwischen den fokalen Kontaktpunkten, die als Orte der Zell-Zell-Kommunikation gelten, und dem Zellkern fungieren. Ein Beispiel für Proteine mit solch einer dualen Funktion, ist β -Catenin, ein Protein, das als Cadherin-Bindungspartner Bestandteil der Zell-Zell-Kontakte ist und unter bestimmten Bedingungen eine Funktion im Zellkern ausübt (Behrens et al., 1996).

Zyxin könnte, unabhängig von einer eventuellen Kernlokalisation, als Signaltransduktionsprotein in der Zelldifferenzierung wirken: es bindet über seine erste LIM-Domäne an die Proteine der CRP ("Cysteine rich proteins") und es konnte gezeigt werden, daß CRP3/MLP eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Muskelzellen spielt (Arber et al., 1994).

Das Epitop, das der andere Zyxin-spezifische monoklonale Antikörper 184A3 erkennt, liegt in einer der Bindungsstellen der EVH1-Domäne der Proteine der Ena/VASP-Familie. Da er nicht das ganze Bindungsmotiv der EVH1-Domäne erkennt, sondern nur einen Zyxin-spezifischen Teilbereich, ist der mAk spezifisch für Zyxin und erkennt keine anderen Proteine, die auch Bindungsstellen der EVH1-Domäne enthalten. Da Zyxin aber vier potentielle Bindungsstellen der EVH1-Domäne enthält, ist es unwahrscheinlich, daß man mit diesen Antikörpern die Bindung der Proteine der Ena/VASP-Familie an Zyxin *in vivo* inhibieren kann.

5.2 Vergleich der Dynamik von Zyxin und Vinculin *in vivo*

Die transiente und stabile Expression des GFP-Zyxin Fusionsproteins macht es erstmals möglich, nicht nur die Dynamik von Zyxin *in vivo* zu untersuchen, sondern sie auch mit der von Vinculin zu vergleichen. Bisher war es nicht möglich, die Dynamik von zwei verschiedenen Proteinen parallel *in vivo* zu untersuchen. Es gibt zwar eine GFP-Mutante, die eine blaue Fluoreszenz aufweist (BFP für Blue Fluorescent Protein), aber eine so geringe Fluoreszenzintensität hat, daß ein BFP-Zyxin Fusionsprotein nicht detektierbar ist (Daten nicht gezeigt). Daher ist es bisher nicht möglich, zwei Proteine als verschiedenfarbige GFP- bzw. BFP-Fusionsproteine für die simultane Untersuchung der *in vivo* Dynamik zu verwenden. Die Kombination der Expression eines GFP-markierten Proteins mit der Mikroinjektion eines Rhodamin-markierten zweiten Proteins ist dagegen eine gute Möglichkeit die Dynamik dieser Proteine *in vivo* nebeneinander zu untersuchen. Mit dieser Methode wird es möglich sein, auch die Dynamik und Funktion weiterer Proteine miteinander zu vergleichen.

Bisher ist erst sehr wenig über das Entstehen der fokalen Kontakte bekannt: An Latex-Beads gebundene anti-Integrin Antikörper, die zwar Integrine binden, sie aber nicht aktivieren, sind in

der Lage Integrine zu Gruppen zusammenzubringen ("clustern"). An diese Integrin-cluster werden dann intrazellulär nur Tensin und die "Focal adhesion kinase" (FAK) rekrutiert. Dies läßt vermuten, daß dieses die ersten Proteine während der Entstehung von fokalen Kontakten sind (Miyaamoto et al., 1995). Weiterhin ist bekannt, daß VASP und Mena durch die prolinreiche EVH1-Bindungsstelle in Vinculin und Zyxin an fokale Kontaktpunkte rekrutiert wird (Pistor et al., 1995; Gertler et al., 1996). Daraus kann man folgern, daß VASP und Mena zu einem späteren Zeitpunkt als Zyxin und Vinculin in entstehende fokale Kontaktpunkte rekrutiert werden.

Aufgrund ihrer Bindung an Integrine kann man vermuten, daß α -Aktinin und Talin nach dem Einbau von FAK und Tensin in die entstehenden fokalen Kontakte rekrutiert werden. Talin bindet auch an Tensin und könnte zusammen mit α -Aktinin und Tensin an der Rekrutierung von Vinculin beteiligt sein (siehe Übersichtsartikel: Jockusch et al., 1995). Über α -Aktinin könnte auch Zyxin in fokale Kontaktpunkte gelangen (Crawford et al., 1992). Dies wäre eine mögliche Erklärung für den beobachteten gleichzeitigen Einbau von Zyxin und Vinculin in entstehende fokale Kontakte. Die Mikroinjektion von Peptiden der Proteinbindungsstellen einzelner Komponenten, wie z.B. der α -Aktinin Bindungsstelle in Vinculin oder Zyxin oder der Vinculin Bindungsstelle in Tensin oder Talin, könnte Aufschluß über die Bedeutung der einzelnen Bindungen für die Rekrutierung von Vinculin oder Zyxin geben. Über die Regulation der Aktivierung von Vinculin ist schon sehr viel bekannt: Phosphorylierung und die Bindung von Proteinen und Phospholipid-"second messengern" führen zu einer Formveränderung, die vorher versteckte Proteinbindungsstellen zugänglich macht (siehe Übersichtsartikel: Jockusch and Rüdiger, 1996; Rüdiger 1998). Auch Zyxin wird in vivo phosphoryliert, ob es aber dadurch aktiviert wird, ist nicht bekannt (Crawford and Beckerle 1991).

Die Bindung von Signaltransduktionsmolekülen wie Kinasen und Adaptermolekülen erfolgt über FAK und Paxillin. Letzteres bindet sowohl an Vinculin, FAK und Tyrosinkinasen der Src-Familie (siehe Übersichtsartikel: Yamada and Geiger, 1997).

F-Aktin wird über eine Vielzahl von Proteinen, wie Talin, Tensin, α -Aktinin, Paxillin und Vinculin an die fokalen Kontakte gebunden (siehe Übersichtsartikel: Jockusch et al., 1995 und **Abbildung 34**).

Man kann daher vermuten, daß Vinculin viel stärker als Zyxin als Mittler zwischen α -Aktinin, Tensin, Talin und F-Aktin in den Aufbau der fokalen Kontaktpunkte eingebunden ist, während Zyxin nur über α -Aktinin an die fokalen Kontakte gebunden zu sein scheint. Diese starke Einbindung von Vinculin ist eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, daß Zyxin in fokalen Kontakten, die sich relativ zum Substrat bewegen oder abgebaut werden, schnell nicht mehr zu detektieren ist, während Vinculin in ihnen verbleibt. Dies gibt einen Hinweis auf eine mögliche

unterschiedliche Funktion von Zyxin und Vinculin. Vinculin könnte mehr am strukturellen Aufbau der fokalen Kontakte beteiligt sein, während Zyxin die Aufgabe haben könnte, die fokalen Kontaktpunkte zu stabilisieren oder Signale weiterzuleiten.

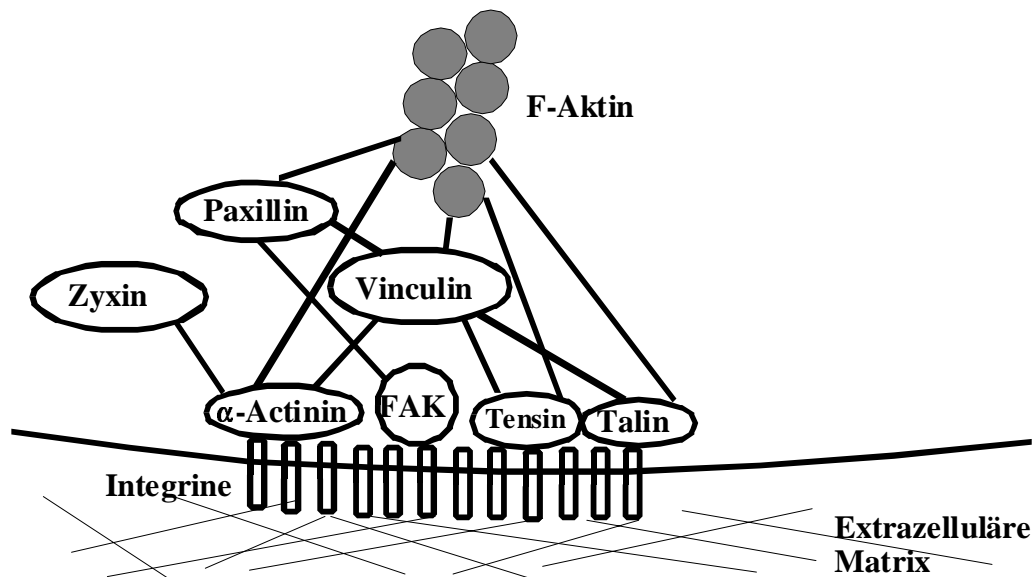


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Protein-Protein Interaktionen in fokalen Kontaktpunkten. Es wurden nur Bindungen und Proteine dargestellt, die für die Verknüpfung zwischen Integrinen und den Stressfasern wichtig zu sein scheinen (Nach einer Abbildung aus Jockusch et al., 1995 und Yamada and Geiger, 1997).

5.3 Klonierung von Fyb/SLAP, ein weiterer Bindungspartner der EVH1-Domäne

Während dieser Arbeit konnte ein weiteres Protein, Fyb/SLAP kloniert werden, daß ebenso wie Zyxin und Vinculin von der EVH1-Domäne der Proteine der Ena/VASP-Familie gebunden wird.

Die Charakterisierung dieses Proteins zeigt, daß die Bindungsstelle der EVH1-Domäne in allen drei Proteinen dazu benötigt wird, Proteine der Ena/VASP-Familie an bestimmte Orte in der Zelle zu dirigieren, an denen Aktinpolymerisation stattfindet.

Trotz dieser Gemeinsamkeit haben diese Proteine wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen, die durch die Rekrutierung zu unterschiedlichen Orten in der Zelle und Interaktion mit anderen Proteinen bedingt wird.

5.4 Fyb/SLAP hat eine begrenzte Homologie zu ActA

Fyb/SLAP enthält ein Bindungsmotiv der EVH1-Domäne (FPPPPDDDI), das in ähnlicher Form vierfach wiederholt im ActA-Oberflächenprotein von *Listeria monocytogenes* zu finden ist. Desweiteren binden VASP und Mena an ähnliche Motive in den Zytoskelettproteinen Zyxin (Gertler et al., 1996; Niebuhr et al., 1997) und Vinculin (Brindle et al., 1996; Reinhard et al., 1996), die in dieser Hinsicht eine begrenzte Homologie zu ActA aufweisen. In der Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP finden sich vier Sequenzen, die ein FPPPP oder LPPPP Motiv enthalten, aber nur eine von ihnen ist eine richtige Bindungsstelle der EVH1-Domäne. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Niebuhr et al. (1997) und Carl et al. (submitted) überein, da saure Aminosäuren, die direkt carboxyterminal dem FPPPP Kernmotiv folgen, entscheidend für die Bindung an die EVH1-Domäne und in den ersten beiden aminoterminalen, potentiellen EVH1-Bindungsmotiven in Fyb/SLAP dagegen nicht zu finden sind. Im Motiv FPAPPKQLDMGD folgen zwar saure Aminosäuren dem Kernmotiv, aber eine Mutation des zweiten Prolines im Kernmotiv zu Alanin, wie von Niebuhr et al. gezeigt wurde, führt schon in der optimalen Umgebung des ActA-Motivs zu einer drastischen Abnahme der Affinität zu EVH1-Domänen. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Affinität der EVH1-Domäne zu dem ActA Peptid SFEFPPPTD abnimmt, wenn das Threonin gegen die basische Aminosäure Lysin ausgetauscht wird, wohingegen alle anderen Aminosäuren an dieser Position weitgehend toleriert werden (Niebuhr et al., 1997). Daher ist anzunehmen, daß dieses Motiv auch eine reale Bindungsstelle für EVH1 Domänen sein könnte, deren Affinität aber sehr gering ist.

Für die Nukleation von neuen Aktinfilamenten an der Oberfläche von Listerien wird der Aminoterminus von ActA benötigt. Weder Zyxin noch Vinculin enthalten Sequenzen, die dem Aminoterminus von ActA ähnlich sind. Interessanterweise enthält Fyb/SLAP eine stark geladene Sequenz aminoterminal zu der Bindungsstelle der EVH1-Domäne, die einem Abschnitt im ActA und im *Listeria ivanovii* iActA ähnelt. Dieser Abschnitt liegt im Aminoterminus von ActA, welcher für die Aktinnukleation verantwortlich ist (siehe **Abbildung 23**) (Pistor et al., 1994,1995; Lasa et al., 1995, 1997). Nur wenige Abschnitte im Aminoterminus von ActA sind im iActA konserviert (nach einer Abbildung aus Lasa et al., 1997).

Bereich 1

IActA	190-SNDDNDSRIDSD <u>EWDD</u> -205
ActA	30-ATDSEDSSLNTD <u>EWEE</u> -45
hSCAR1	543-SDSEDDSEFDEVD <u>WLE</u> -559
WASP	485-GEDQAGDEDED <u>EWDD</u> -502
N-WASP	505-DEDDDED <u>FEDD</u> <u>EWED</u> -521

Bereich 2

IActA	206-GEEAKEKV <u>EEGKA</u> EEKN-----NLGQ <u>EEISE</u> EARERDLQ <u>ELEK</u> MG-245
ActA	46-EKT <u>EEQ</u> PS <u>EVNT</u> -----GPRY <u>ETARE</u> VSS <u>RDIKE</u> LEKSN- 79
Fyb/SLAP	451--L <u>EEQ</u> DS <u>EGETY</u> EDIEASKER <u>EKKREKEE</u> <u>KKRLE</u> <u>ELEK</u> KE-489
IActA	246-KV <u>K</u> NANVTALL <u>AML</u> DS <u>RAGK</u> VARQ-270
ActA	80-KV <u>RNT</u> NKADLI <u>AMLKE</u> <u>KA</u> EKGPN-103

Bereich 3

IActA	291-KEILSDEQNRVPMNSGKIKNRRKAIEGSDMEDSD-324
ActA	128-IQVERRHPGLPSDSAAEIKRRKAIAS <u>SD</u> SELES-161
hScar1	533-ILSRRI <u>AVEY</u> <u>SD</u> SEDDSD-550
WASP	474-MQKRSRAIHSSDEGEDQ-490
N-WASP	491-MQKRSKAIHSSDEDEDE-507

Der Bereich 1 ähnelt einem Abschnitt, der sogenannten "Acidic domain" (Bear et al., 1998; siehe Übersichtsartikel: Bi and Zigmond, 1999) am Carboxyterminus von WASP, N-WASP und hScar1.

Der Bereich 2 ähnelt dem oben erwähnten Abschnitt in Fyb/SLAP. Peptide, die diesen Bereich in ActA und iActA abdecken, binden in vitro an G- und F-Aktin (Lasa et al., 1997). Interessant ist, daß die fünf bzw. sechs in der Sequenz von ActA und iActA deletierten Aminosäuren in der Fyb/SLAP Sequenz einer potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstelle bzw. Bindungsstelle für SH2-Domänen entsprechen. Daher ist zu vermuten, daß eine mögliche F- und G-Aktinbindung über eine Tyrosinphosphorylierung reguliert werden könnte. Eine durch zelluläre Faktoren regulierte F-Aktinbindung wäre für intrazelluläre Bakterien, wie *L. monocytogenes* und *ivanovii*, von Nachteil. So ist es sehr gut vorstellbar, daß diese Bakterien während der Evolution

diese F-Aktinbindungsstelle aus ihren Wirtszellen übernommen, aber die Regulationsstelle unter Beibehaltung der Funktion entfernt haben. Der Selektionsvorteil einer nicht von der Zelle regulierten F-Aktinbindung könnte jene Bakterien bevorzugt haben, in denen diese Deletion durch Mutation stattgefunden hat. Ob sowohl diese aminoterminal Sequenz im ActA und iActA, als auch die analoge Sequenz in Fyb/SLAP tatsächlich in der Aktinnukleation und/oder in der Aktinpolymerisation eine Rolle spielen, ist eine wichtige Frage, der weiter nachgegangen werden sollte.

Die Aminosäuresequenz im Bereich 3 wiederum findet man ähnlich als sogenannte "Cofilin Homologie Domäne" in WASP, N-WASP und hScar1 (May et al., submitted) und es wurde gezeigt, daß dieser Abschnitt im ActA für die Nukleation von Aktinfilamenten entscheidend ist (Pistor et al., 1995; Lasa et al., 1997). Da ActA alle für die Aktinnukleation und -polymerisation wichtigen Domänen in einer Art "Molekularen Mimikry" in seiner Aminosäuresequenz vereint, könnten diese Domänen für die zelluläre Aktinnukleation und -polymerisation in einem Komplex zusammengebracht werden.

Zusätzlich enthält Fyb/SLAP eine Sequenz, die eine hohe Homologie zur G-Aktin Bindungsstelle im Thymosin- β 4 (Van Troys et al., 1996) hat. Ob Fyb/SLAP in der Lage ist, an G-Aktin zu binden, muß aber noch gezeigt werden.

5.5 Fyb/SLAP wird in zwei Isoformen exprimiert

Fyb/SLAP wird in verschiedenen Zelllinien, wie in der HL60-Zelllinie und der Maus T-Zelllinie DC27.10 in zwei Isoformen exprimiert, die eine verwandte Struktur besitzen, aber nicht durch Phosphorylierung oder Glycosilierung entstehen (Da Silva et al., 1997 a). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, liegen den beiden Isoformen zwei verschiedene cDNAs zugrunde, wobei in der Fyb/SLAP2 kodierenden Sequenz zusätzlich 138 bp zu finden sind. Dies führt zu einem um 46 Aminosäuren längeren Protein, in welchem die Insertion direkt hinter der Bindungsstelle der EVH1-Domäne erfolgt. Die affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper #81, die gegen ein Peptid hergestellt wurden, dessen Sequenz in diesen 46 Aminosäuren enthalten ist, erkennen nur die 130 kDa Isoform. Damit wurde gezeigt, daß diese 46 Aminosäuren für das langsamere Laufverhalten von Fyb/SLAP2 in der SDS-Gelelektrophorese verantwortlich sind.

Da diese zusätzlichen 46 Aminosäuren direkt hinter der Bindungsstelle der EVH1-Domäne inseriert sind, ist es möglich, daß sie auch die Zugänglichkeit dieser Bindungsstelle für die EVH1-Domäne beeinflussen. Da die Koimmunpräzipitation von Fyb/SLAP mit VASP nur mit Extrakten aus Jurkat T-Zellen, in denen nur Fyb/SLAP1 vorkommt, durchgeführt wurde, ist nicht auszuschließen, daß die Bindung an Fyb/SLAP2 *in vivo* unter anderen Regulationsbedingungen erfolgt. In einem Overlay Experiment bindet aber zumindest ein

Fyb/SLAP2 Fragment *in vitro* an die EVH1-Domäne, so daß man annehmen kann, daß Fyb/SLAP2 auch *in vivo* ein Bindungspartner der Ena/VASP Proteinfamilie ist. Koimmunpräzipitationen aus Extrakten verschieden stimulierter Thrombozyten, in denen beide Isoformen enthalten sind, sollten eventuelle Unterschiede *in vivo* in der Bindung der Fyb/SLAP Isoformen durch die EVH1-Domäne aufzeigen können.

Durch einen *in vitro* Kinase Assay an Immunpräzipitaten von *fyn*^{-/-} ("Knockout") Mäusen im Vergleich zum Wildtyp wurde festgestellt, daß Fyb/SLAP von Fyn und mindestens von einer weiteren Kinase tyrosinphosphoryliert wird, wobei die 130 kDa Isoform hauptsächlich durch Fyn phosphoryliert wird (Da Silva et al., 1997 a). Da in den 46 zusätzlichen Aminosäuren von Fyb/SLAP2 keine potentielle Tyrosinphosphorylierungsstelle, dafür aber ein stark geladener Bereich vorhanden ist, könnte diese Selektivität eher an einer unterschiedlichen Zugänglichkeit der auch im Carboxyterminus gelegenen potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen liegen. Diese Zugänglichkeit könnte durch intra- oder intermolekulare Proteinwechselwirkungen reguliert werden, wie es beispielsweise im Vinculin durch die intramolekulare Bindung der Kopfdomäne an die Schwanzdomäne erfolgt (siehe Übersichtsarbeit: Jockusch and Rüdiger, 1996).

Phosphorylierung an Tyrosinen kann zwei Auswirkungen haben. Zum einen können an spezifische Tyrosin-phosphorylierte Motive Proteine mit SH2-Domänen binden, wodurch Proteinkomplexe gebildet werden und auch die Funktion des Proteins reguliert werden kann, zum anderen kann auch die Phosphorylierung selbst eine Auswirkung auf die Konformation und damit auf die Funktion des Proteins haben. So könnte diese Phosphorylierung von Fyb/SLAP die Bindung an die EVH1-Domäne und auch die Bindung der carboxyterminal gelegenen Fyb/SLAP SH3-Domäne an c-Abl regulieren.

5.6 Die subzelluläre Lokalisation gibt Hinweise auf eine mögliche Funktion von Proteinen

Die mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie festgestellte subzelluläre Lokalisation vieler Proteine gibt einen guten Hinweis auf eine mögliche Funktion eines Proteins. So wurden unter anderem Zyxin, VASP, Vinculin und α -Aktinin zuerst durch die Immunfluoreszenzmikroskopie als Zytoskelettproteine identifiziert.

Da Fyb/SLAP sowohl in T-Zellen an Orten schneller Aktinreorganisation wie Lamellipodien und an der Kontaktfläche aktivierter T-Zellen mit anti-CD3 Beads, als auch in den Lamellipodien sich ausbreitender aktivierter Thrombozyten zu finden ist, ist anzunehmen, daß dieses Protein auch eine Funktion im Aktinzytoskelett einnimmt.

Da in diesen hämatopoietischen Zellen auch Zyxin und Vinculin exprimiert werden, diese aber in Thrombozyten vor allem in den fokalen Kontaktpunkten zu finden sind, werden sie wahrscheinlich eine andere Funktion als Fyb/SLAP in der Regulation der Aktinpolymerisation haben. Dieses könnte eine gezielte räumlich getrennte Induktion der Aktinpolymerisation sein, um so verschiedene auf dem Aktinzytoskelett beruhende Vorgänge, wie Lamellipodien-, Filopodien und Stressfaserbildung getrennt ablaufen zu lassen.

5.7 Rolle von Fyb/SLAP in der T-Zell Signaltransduktion

Fyb/SLAP ist ein Teil der T-Zell Rezeptor Signalkaskade, in der es als Bindungspartner der SH2-Domäne von Fyn und SLP-76 fungiert, seine mögliche Funktion, Verstärkung oder Inhibition der IL-2 Sekretion als Antwort auf die T-Zell Rezeptor Bindung aber wird kontrovers diskutiert (Da Silva et al., 1997 b; Musci et al., 1997). Wenn T-Zellen an Antigen-präsentierende Zellen (APC) binden, werden sie über CD3 vermittelte Signaltransduktionswege aktiviert, neue Aktinfilamente werden polymerisiert und ihr Aktinzytoskelett wird auf die Antigen-präsentierende Zelle hin ausgerichtet. Für eine ordnungsgemäße T-Zell Antwort ist die Reorganisation des Aktinzytoskeletts eine wichtige Voraussetzung. Dies führt auch zu einer gerichteten Exozytose von Signalmolekülen und damit Zell-Zell Kommunikation mit der Antigen-präsentierenden Zelle in einer überfüllten zellulären Umgebung. Dies ist in Übereinstimmung mit Experimenten, die zeigen, daß Cytochalasine, Pilzgifte, welche die Polymerisation von Aktin verhindern, einen Effekt auf die Proliferation und Interleukin-2 Produktion von an APC gebundenen T-Zellen haben (Geppert and Lipsky, 1990; Matsuyama et al., 1991).

Die Tatsache, daß Fyb/SLAP in Lamellipodien von anti-CD3 aktivierten T-Zellen gefunden wird und daß es möglicherweise Profilaktin durch VASP und Mena rekrutiert, macht es zum ersten Protein, das die T-Zell Rezeptor Signalkaskade mit der Reorganisation des Aktinzytoskeletts in T-Zellen verbindet.

5.8 Die Bindung von Proteinen der Ena/VASP-Familie an Proteine mit EVH1-Bindungsstellen ist für die Aktinreorganisation während der T-Zell Aktivierung essentiell

Eine chromosomale ActA Deletionsmutante, der die prolinreiche Repeatdomäne fehlt, kann nur noch sehr ineffizient Aktinschweife bilden. So werden nur sehr kurze Aktinschweife gebildet.

Hiermit konnte gezeigt werden, daß VASP und Mena tatsächlich die Aktinpolymerisation an Listerien beschleunigen können (Niebuhr et al., 1997; Smith et al., 1996).

Da nicht nur Fyb/SLAP, sondern auch Zyxin und Vinculin EVH1-Bindungsstellen enthalten und in T-Zellen exprimiert werden und nicht auszuschließen ist, daß es noch weitere, unbekannte Proteine mit EVH1-Bindungsstellen in T-Zellen gibt, wurde ein anderer Versuchsansatz gewählt: Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, binden die Proteine der Ena/VASP-Familie mit einer weitaus größeren Affinität an die EVH1-Bindungsstellen im ActA als an ihre zellulären Bindungspartner (Niebuhr et al., 1997). Die Transfektion der ActA EVH1-Bindungsstellen führt deshalb zu einer Delokalisation aller Ena/VASP-Proteine von ihren natürlichen Bindungsstellen. Dadurch wird die Aktinpolymerisation während der T-Zell Aktivierung inhibiert. Dieses Ergebnis unterstützt die mit dem Listerien-Modellsystem erarbeitete Erkenntnis, daß Proteine der Ena/VASP-Familie *in vivo* die Aktinpolymerisation beschleunigen könnten. Zusätzlich zeigt es, daß das Listerien-System ein gutes Modell für die zelluläre Aktinpolymerisation ist.

Ob nur Fyb/SLAP oder auch Vinculin, Zyxin und andere Proteine mit Bindungsstellen der EVH1-Domäne an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts in T-Zellen beteiligt sind, kann aus diesem Experiment nicht abgeleitet werden. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen deuten darauf hin, daß Zyxin und Vinculin, zumindest unter den gewählten Bedingungen, nicht an der Kontaktstelle zwischen anti-CD3 beschichteten Beads und aktivierten T-Zellen zu finden sind. Es wurde aber beschrieben, daß Zyxin an Vav bindet, das sich in dem Komplex an dieser Kontaktstelle findet. Da aber die Bindung zwischen Zyxin und Vav nur *in vitro* und in "Two Hybrid"-Experimenten untersucht wurde (Hobert et al., 1996), sollten Koimmunpräzipitationsversuche aus Lysaten aktivierter T-Zellen aufschlußreichere Ergebnisse liefern.

5.9 Fyb/SLAP könnte an der Kontrolle der Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der T-Zell Aktivierung beteiligt sein

Fyb/SLAP empfängt Signale aus verschiedenen Signaltransduktionswegen, die an der Kontrolle der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. Fyb/SLAP wird in T-Zellen als Antwort auf die Bindung an den T-Zell Rezeptor an Tyrosinen phosphoryliert und dann von den SH2 Domänen von Fyn und SLP-76 gebunden (Da Silva et al., 1997 b; Musci et al., 1997). Fyn gehört zur Src-Familie der Protein-Tyrosin Kinasen, dessen p59^{fyn(t)} Isoform in T-Zellen exprimiert wird. Fyn bindet konstitutiv an den TCR- ζ / CD3 Komplex (Samelson et al., 1990) und ist an der T-Zell Aktivierung beteiligt (Rudd et al., 1993).

Interessanterweise kann die SH3-Domäne von p59^{fyn(t)} an ein prolinreiches Motiv in der p85 Untereinheit der PI(3)-Kinase binden, die an der Zytoskelettorganisation mittels D3 Phosphatidylinositolphosphaten beteiligt ist, was diese Signalmoleküle in einem Komplex an bestimmten Orten in der Zelle zusammenbringt (Prasad et al., 1993). Weiterhin bindet die SH2-Domäne von Fyn an α -Tubulin, das während der T-Lymphozytenaktivierung tyrosinphosphoryliert wird. Dies läßt vermuten, daß Fyn während der T-Zell Aktivierung auch an der Reorganisation der Mikrotubuli beteiligt ist (Marie-Cardine et al., 1995).

Das an Fyb/SLAP bindende Protein SLP-76 wird während der Aktivierung der T-Zellen tyrosinphosphoryliert und dann von der SH2-Domäne von Vav gebunden (Tuosto et al., 1996; Raab et al., 1997). Vav ist ein Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (GEF) für Rho GTPasen (Olsen et al., 1996; Crespo et al., 1997; Han et al., 1997) und ist deshalb in der Signaltransduktionskaskade oberhalb dieser "Schlüsselregulatoren" des Aktin-Zytoskeletts einzuordnen. Die Untersuchung von Vav^{-/-} "Knockout" T-Zellen zeigte, daß Vav für die T-Zell Rezeptor vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts essentiell ist. Weiterhin bestätigten diese Untersuchungen frühere Befunde, daß ohne eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts die Aktivierung der T-Zellen nicht stattfindet (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998). In aktivierten T-Zellen befindet sich Vav mit SLP-76 und Fyb/SLAP in einem Komplex. Auf diese Weise ist ein GEF für Rho-GTPasen in der Nähe von Fyb/SLAP an einem Ort, an dem eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts stattfindet. Dies läßt vermuten, daß Vav regulierend auf die Funktion von Fyb/SLAP einwirkt.

Kürzlich wurde das 36 kDa Phosphoprotein (p36) kloniert, welches ein auffälliges Substrat für TCR-aktivierte Protein-Tyrosin Kinasen ist (siehe Übersichtsartikel: Cantrell, 1998), und LAT genannt (für "Linker for activation of T-cells") (Zhang et al., 1998). LAT ist ein Transmembranprotein mit einem langen zytosolischen Schwanz, der neun zwischen Maus und Mensch konservierte Tyrosin-Reste enthält. LAT/p36 wurde zuerst als ein 36 kDa großes, tyrosinphosphoryliertes Protein identifiziert, das in aktivierten T-Zellen an die SH2-Domäne von Grb2 bindet. In diesen Komplexen wird auch SLP-76 und die PI(3)-Kinase gefunden, wobei SLP-76 direkt an Grb2 bindet. SLP-76 wiederum bindet an Vav und an Fyb/SLAP. Deshalb ist LAT ein guter Kandidat diese Signalproteinkomplexe, die Fyb/SLAP enthalten, an die Plasmamembran in die Nähe des TCR-Komplex zu dirigieren, wo auch die Aktinpolymerisation stattfindet.

Die c-Abl Tyrosinkinase kann direkt an monomeres und filamentöses Aktin binden (Van Etten et al., 1994). Bei 95 % der Patienten, die an Chronischer Myeloischer Leukämie leiden (CML), wird eine chromosomale Translokation zwischen dem Gen der *c-abl* Tyrosinkinase und *bcr* gefunden, die zu einem BCR/Abl Fusionsprotein führt (Rowley, 1973). Hämatopoietische Zelllinien, die BCR/Abl exprimieren, zeigen eine dramatisch verstärkte Zunahme ihrer spontanen

Motilität, verstärktes Membran-ruffling und die Ausbildung von langen, aktinreichen Filopodien (Salgia et al., 1997), was vermuten läßt, daß eine veränderte Aktin-bedingte Motilität als ein Hauptfaktor zur Pathologie der CML beitragen könnte.

Die direkte Interaktion der SH3-Domäne von Fyb/SLAP mit der c-Abl Tyrosinkinase könnte bewirken, daß Fyb/SLAP durch c-Abl an Tyrosinen phosphoryliert und damit auch dessen Aktivität reguliert wird. Fyb/SLAP wird während der T-Zell Aktivierung wahrscheinlich durch Fyn, Lck, ZAP-70 oder c-Abl Tyrosin-phosphoryliert. Ob dadurch die Bindung der EVH1-Domäne reguliert wird und ob Fyb/SLAP tatsächlich ein Substrat der c-Abl Tyrosin-Kinase ist, muß noch gezeigt werden.

5.10 Ein Komplex, der an den T-Zell Rezeptor aktivierter T-Zellen rekrutiert wird, könnte die ActA analoge Funktion haben, die Aktinnukleation und -polymerisation zu initiieren

Zwei Bereiche im ActA Protein von *Listeria monocytogenes* sind für die intrazelluläre Bewegung nötig. Der Aminoterminal ist für die Nukleation von neuen Aktinfilamenten entscheidend (Lasa et al., 1995; 1997; Pistor et al., 1995). Die Prolin-reichen "Repeats" könnten die Aktinpolymerisation über die Rekrutierung von Proteinen der Ena/VASP-Familie, die wiederum Profilaktin binden, verstärken (Niebuhr et al., 1997; Smith et al., 1996).

Es wurde gezeigt, daß der Arp2/3 Komplex *in vitro* die Nukleation neuer Aktinfilamente bewirken kann, wobei aber die Verzögerungsphase vor Beginn der Aktinpolymerisation erhalten bleibt (Dyche Mullins et al., 1998). Diese Verzögerungsphase entfällt, wenn zusätzlich ActA anwesend ist (Welch et al., 1998). Der gereinigte Arp2/3 Komplex reicht aus, die Aktinpolymerisation an der Oberfläche von *Listeria monocytogenes* zu starten (Welch et al., 1997 b). Kürzlich wurde publiziert, daß WASP und Scar ein zellulärer Bindungspartner des Arp2/3 Komplexes ist (Machesky and Insall, 1998). Der Arp2/3 Komplex ist für die Aktin-vermittelte Bewegung der Listerien essentiell, da carboxyterminale Fragmente von Scar, welche die Bindungsstelle des Arp2/3 Komplexes einschließen, *in vitro* und *in vivo* die Bildung des Aktinschweifes und damit auch die Listerienbewegung inhibieren können (May et al., submitted). Daher wird vermutet, daß WASP und Scar eine dem Aminoterminal von ActA analoge Funktion haben könnte (siehe Übersichtsartikel: Bi and Zigmond, 1999).

Wie man am Beispiel des Modellsystems *Listeria monocytogenes* sehen kann, werden für eine effektive Aktinpolymerisation, die an die Nukleation anschließt, aber auch Proteine der Ena/VASP-Familie benötigt, die Profilaktin rekrutieren.

Dies ist auch bei einem weiteren fakultativ intrazellulären Bakterium *Shigella flexneri* der Fall. *Shigella flexneri* ist wie *L. monocytogenes* in der Lage, die Nukleation von neuen

Aktinfilamenten an seiner Oberfläche zu induzieren und sich durch die Polymerisation dieser Filamente an einem Bakteriumpol durch das Zytoplasma fortzubewegen. Das einzige dafür notwendige bakterielle Protein IcsA/VirG (Goldberg and Theriot, 1995; Kocks et al., 1995) hat zwar keine Homologie zu ActA, ist aber in der Lage, N-WASP zu rekrutieren, das essentiell für die *Shigella*-Bewegung ist (Suzuki et al., 1998) und eine hohe Homologie zu WASP hat (Miki et al., 1996). Die in WASP und hScar1/WAVE für die Bindung an den Arp2/3 Komplex nötige sogenannte "Cofilin Homologie Domäne" ist auch in N-WASP konserviert (Machesky and Insall, 1998), so daß man auch eine Bindung von N-WASP an den Arp2/3 Komplex annehmen kann. Auf diese Weise könnte *Shigella flexneri* die Funktion des Aminoterminus von ActA imitieren. Für die Bewegung von *S. flexneri* sind aber auch die Proteine der Ena/VASP-Familie notwendig, da die Mikroinjektion eines Peptides der prolinreichen EVH1-Bindungsstelle im ActA die Bewegung der Shigellen in infizierten Zellen stoppt (Zeile et al., 1996). Da Vinculin an IcsA/VirG (Suzuki et al., 1996) und VASP bindet (Reinhard et al., 1996; Brindle et al., 1996) könnte dieses für die Rekrutierung der Proteine der Ena/VASP-Familie verantwortlich sein (Laine et al., 1997).

Da für die Aktinnukleation und -polymerisation an zwei nichtverwandten Bakterien die Rekrutierung sowohl des Arp2/3 Komplexes, als auch der Proteine der Ena/VASP-Familie notwendig zu sein scheint, ist es wahrscheinlich, daß beide Komponenten auch in der zellulären Aktinnukleation und -polymerisation in einem Komplex zu finden sind.

WASP, das an den Arp2/3 Komplex bindet und Fyb/SLAP, das die Proteine der Ena/VASP-Familie rekrutieren kann, kolokalisieren in aktivierten T-Zellen an der Kontaktstelle mit den anti-CD3 beschichteten Beads und lassen sich aus Extrakten von aktivierten T-Zellen koimmunpräzipitieren. Beide können in aktivierten T-Zellen in einen Komplex an dem Ort, an dem eine dichte Ansammlung ("clustering") der T-Zell Rezeptoren stattfindet, rekrutiert werden, wobei dies durch eine direkte oder indirekte Bindung erfolgen kann. Das Transmembranprotein LAT wird, wenn der T-Zell Rezeptor aktiviert wird, phosphoryliert und rekrutiert über die Bindung der SH2-Domäne von Grb2 das Adapterprotein SLP-76, das auch Tyrosin-phosphoryliert wird und eine zentrale Rolle in der T-Zell Signalkaskade einnimmt (siehe Übersichtsarbeit: Rudd, 1999). Die SH2-Domänen von Vav (Tuosto et al., 1996) und dem Adapterprotein Nck binden an das phosphorylierte SLP-76 und bilden *in vivo* einen ternären Komplex (Bubeck Wardenburg et al., 1998). Nck wiederum bindet *in vitro* und *in vivo* über seine SH3-Domäne an WASP (Rivero-Lezcano et al., 1995), welches an den Arp2/3 Komplex bindet (Machesky and Insall, 1998).

SLP-76 bindet mit seiner SH2 Domäne an das phosphorylierte Fyb/SLAP (Da Silva et al., 1997 b; Musci et al., 1997), das, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ein Bindungspartner der Proteine der Ena/VASP-Familie ist.

Dieser Komplex enthält damit sowohl eine Komponente, WASP, die den Arp2/3 Komplex rekrutiert, welche die Funktion des Aminoterminus von ActA übernimmt, als auch eine Komponente, Fyb/SLAP, die über die Rekrutierung der Proteine der Ena/VASP-Familie und damit auch Profilactin, die Aktinpolymerisation beschleunigen könnte. Damit könnte dieser Komplex das erste funktionelle, zelluläre ActA Analog sein (siehe **Abbildung 35**) .

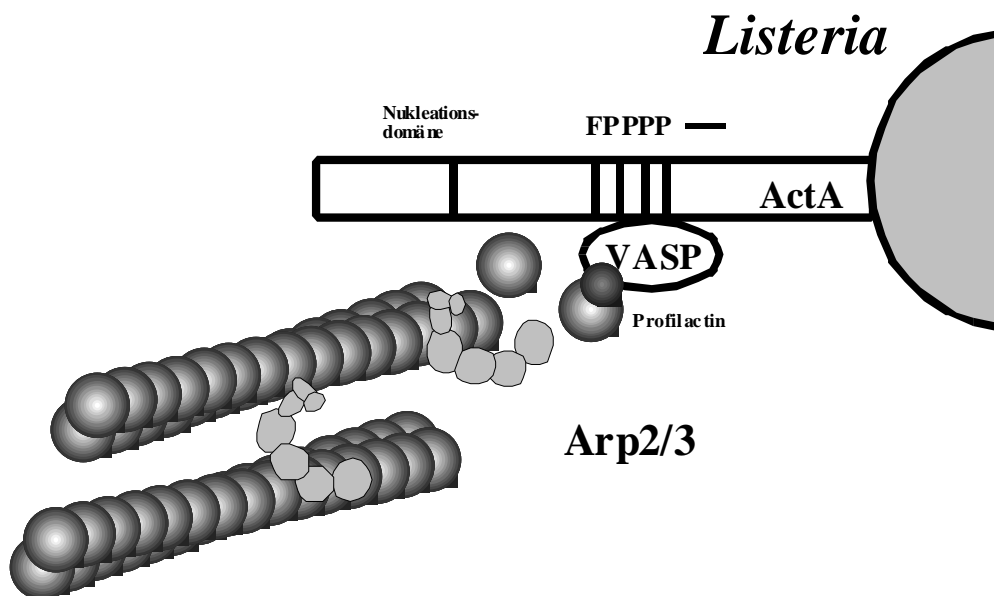
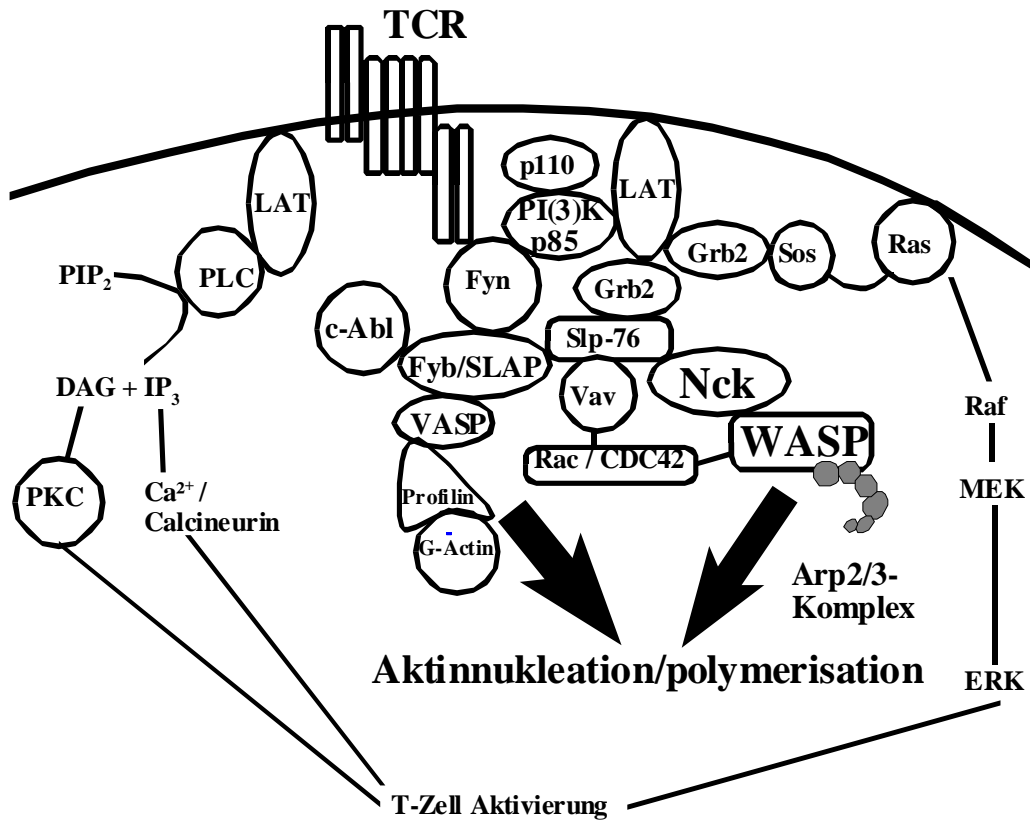


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege in T-Zellen, die zu ihrer Aktivierung und der Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen. Darunter ist zum Vergleich das Listerienmodell System gezeigt. Beschreibung der einzelnen Bindungen siehe Text.

Es ist nicht ungewöhnlich, daß wichtige zelluläre Prozesse, wie die Aktinnukleation und -polymerisation durch einen Komplex initiiert und reguliert werden. So sind Multienzym-Komplexe, die als "Protein-Maschinen" fungieren, an der Replikation der DNA oder der Synthese von Proteinen beteiligt (Alberts et al., 1990).

In einem Komplex können solch essentielle Vorgänge, wie die Aktinpolymerisation, sehr gut reguliert werden, da Signale aus verschiedenen Signaltransduktionswegen einfließen können. Dies ist wichtig, da sowohl der Ort als auch der Zeitpunkt der Initiation der Aktinpolymerisation von vielen Faktoren, wie Umgebung der Zelle, Zustand der Zelle im Zellzyklus und Kommunikation der Zelle mit anderen Zellen eine Rolle in der Entscheidung der Zelle spielen, sich zu bewegen oder die Zellteilung einzuleiten, in der während der Zytokinese auch das Aktinzytoskelett wichtig ist. Bei der Regulation dieser komplexen Vorgänge sind eventuell auch redundante Sicherungsmechanismen nötig, die sich sehr gut in einem Komplex integrieren lassen.

Listeria monocytogenes hat dagegen alle für die Aktinnukleation und -polymerisation erforderlichen Domänen auf einem Protein, ActA, vereinigt und sie so der zellulären Regulation der Aktinpolymerisation entzogen. Die zelluläre Aktinpolymerisation wird durch die Familie der Rho-GTPasen reguliert und die Inaktivierung dieser Proteine durch das *Clostridium difficile* Toxin B (TcdB-10463) führt zum Zusammenbruch des normalen Aktinzytoskeletts, verhindert aber die Listerienbewegung nicht (J. Wehland, persönliche Mitteilung).

5.11 Rolle von Fyb/SLAP in Thrombozyten

Humane Thrombozyten verändern nach einer Stimulation durch verschiedene Agenzien, die bei einer Gewebsverletzung freigesetzt werden, ihre Form dramatisch. Zuerst verwandelt sich die Scheibe in eine Kugel, die dann zwei Arten von Oberflächenausläufern vorschleibt, fingerartige Filopodien und flache Lamellipodien (Hartwig, 1992). Dies führt zur Ausbildung eines dreidimensionalen Blutgerinnsels, welches für die physiologische Hämostase aber auch für thromboseartige pathologische Zustände, wie Herzinfarkt, periphere Gefäßinsuffizienz und Schlaganfall verantwortlich ist (Hartwig et al., 1995). Kürzlich wurde gezeigt, daß eine Thrombozytenaktivierung durch Kollagen durch einen ähnlichen Signaltransduktionsweg vermittelt wird, wie er bei der T-Zell Aktivierung vorkommt (Übersichtsartikel von Watson and Gibbins, 1998): Es wird vermutet, daß ein Komplex aus Integrin $\alpha_2\beta_1$, GPVI und dem Fc- γ -

Rezeptor IIA als Rezeptor für Kollagen fungiert, in der die Fc-Rezeptor- γ -Kette ein ITAM ("Immune receptor based activation motif") enthält. In Thrombozyten bindet im Gegensatz zu T-Zellen die Tyrosin-Kinase Syk statt der mit ihr verwandten ZAP-70 Kinase an das phosphorylierte ITAM in der Fc-Rezeptor- γ -Kette. In aktivierten Thrombozyten werden tyrosinphosphorylierte Proteine von 36, 63, 75, 120 und eine breite Bande über 123 kDa gefunden (Robinson et al., 1996). Durch Westernblotanalyse wurde p75 als SLP-76 identifiziert, während p36 sich ähnlich wie das kürzlich klonierte LAT verhält. p120 und die breite Bande über 123 kDa könnten mit den 120 und 130 kDa großen Isoformen von Fyb/SLAP identisch sein. Grb2 wird auch in Thrombozyten gefunden, in denen seine SH3-Domäne, wie in T-Zellen, an SLP-76 bindet (Robinson et al., 1996). Da ein Symptom des Wiskott-Aldrich Syndroms eine Thrombozytopenie ist, die auf Zytoskelettanomalitäten in Thrombozyten beruht (siehe Übersichtsartikel: Nonoyama and Ochs, 1998), ist es wahrscheinlich, daß WASP eine Rolle im Aktinzytoskelett von Thrombozyten spielt und es einen ähnlichen Komplex wie in T-Zellen geben könnte. Auch den Arp2/3 Komplex findet man in Thrombozyten, aus denen der humane Arp2/3 Komplex biochemisch isoliert wurde (Welch et al., 1997 c).

Zusammengefaßt läßt dies vermuten, daß ähnliche Signaltransduktionswege wie in T-Zellen existieren, die zur Thrombozytenaktivierung und zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen.

Ein weiterer Hinweis für diese Hypothese kann aus der Untersuchung von SLP-76 "Knock out" Mäusen gewonnen werden, die subcutane und intraperitoneale Blutungen, eine geringere Lebenserwartung und eine Blockade in der Entwicklung des Thymus haben (Pivniouk et al., 1998).

Die Untersuchung von VASP "Knock out" Mäusen liefert dagegen konträre Hinweise. Diese Mäuse haben eine normale Lebenserwartung, keine veränderte Thrombozytenzahl und eine normale Blutungszeit. Besonders bemerkenswert ist aber, daß die durch Kollagen induzierte Aggregation der Thrombozyten in den VASP^{-/-}-Thrombozyten schneller verläuft, als in normalen Thrombozyten. Da der inhibitorische Effekt der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP auf die Thrombozyten-Aggregation in den VASP^{-/-}-Thrombozyten fast nicht vorhanden ist, wurde daraus geschlossen, daß er in VASP^{+/+}-Thrombozyten zumindest teilweise durch VASP bewirkt wird (Aszódi et al., 1999). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zur Theorie, die besagt, daß die Proteine der Ena/VASP Familie die Aktinpolymerisation beschleunigen könnten. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die Tatsache sein, daß sowohl im Wildtyp, als auch in den VASP^{-/-}-Thrombozyten auch Evl, aber nicht Mena exprimiert wird (Aszódi et al., 1999). Evl könnte nicht nur den Verlust von VASP ausgleichen, sondern sogar eventuell effektiver als VASP die Aktinpolymerisation beschleunigen. Eine andere Möglichkeit ist, daß die Regulation der Aktinpolymerisation, an der VASP und auch die

anderen Mitglieder der Ena/VASP Familie beteiligt sind, komplexer als bisher vermutet ist. Dies würde auch bedeuten, daß die Schlußfolgerungen, die aus dem Listerien-Modellsystem gezogen wurden, überdacht werden müssten. Um diese Diskrepanz aufzuklären wäre es hilfreich Zellen von Mäusen zu untersuchen, in denen auch Evl und Mena in einem "Dreifach-Knock out" fehlen. Auch die *in vitro* Rekonstitution des Listerien-Modellsystems nur mit rekombinanten Proteinen sollte helfen die wirkliche Funktion der einzelnen Mitglieder der Ena/VASP Familie aufzuklären.

Die Lokalisierung von Fyb/SLAP an der Front der Lamellipodien, seine Bindung an SLP-76, das an einer Signaltransduktionskaskade in aktivierten Thrombozyten beteiligt ist, seine mögliche Rekrutierung von Profilaktin durch VASP und seine Kolo-kalisation in einem Komplex mit WASP, macht Fyb/SLAP zu einem interessantem Kandidaten, der an der Ausbreitung von Lamellipodien und damit auch an der physiologischen Funktion der Thrombozyten beteiligt sein könnte.

Viele Signaltransduktionsmoleküle, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der T-Zellaktivierung beteiligt sind, werden in einem Komplex oder in großer Nähe zu Fyb/SLAP gefunden, das direkt am Aktinpolymerisationsprozess beteiligt sein könnte. Dies läßt vermuten, daß Fyb/SLAP eine Rolle in der Integration dieser Signale und in der Kontrolle des Aktin-Polymerisationsprozesses spielen könnte, der zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der Aktivierung der T-Zellen und zur Ausbreitung von Lamellipodien hämatopoietischer Zellen führt.

5.12 Andere Modellvorstellungen der Regulation der Aktinpolymerisation

Die Polymerisation von Aktinfilamenten liefert die treibende Kraft, wenn eine Zelle ein Lamellipodium vorschiebt (Mitchison and Cramer, 1996). Zum einen können neue Aktinfilamente durch Nukleation entstehen, zum anderen existierende Filamente verlängert werden. Da die Plusenden vorhandener Filamente normalerweise durch "Capping Proteine" blockiert sind, können freie Plusenden durch Entfernen der "Capping Proteine" oder durch Zerschneiden ("severing") der Filamente erzeugt werden (Welch et al., 1997 a).

Als Mechanismus für die Aktinreorganisation in aktivierten Thrombozyten wurde die Verlängerung von existierenden Aktinfilamenten postuliert (Hartwig, 1992). Dazu ist das Entfernen ("uncapping") der "Capping Proteine" durch die Phosphatidylinositolphosphat "Lipid second messenger" in permeabilisierten Thrombozyten untersucht worden (Hartwig et al., 1995). Dort wurde gezeigt, daß durch die Bindung eines aktivierenden Liganden an den

Thrombinrezeptor in ruhenden, permeabilisierten Thrombozyten, die Aktinpolymerisation erhöht wird. Dies ist auch der Fall, wenn die D4 Phosphatidylinositolphosphate (PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂, PI(4)P) zu den ruhenden permeabilisierten Thrombozyten gegeben wurden. Da diese "lipid second messenger" auch "Capping Proteine", wie Gelsolin von den Plusenden existierender Aktinfilamente entfernen können, wurde daraus geschlossen, daß die Aktinreorganisation in Thrombozyten durch das Entfernen der "Capping Proteine" bewerkstelligt wird.

Obwohl gut belegt wurde, daß diese "lipid second messenger" eine wichtige Rolle in der Aktinreorganisation von Thrombozyten einnehmen, wurde nicht belegt, ob dies durch Entfernen der "Capping Proteine", Zerschneiden ("severing") existierender Filamente oder Nukleation neuer Filamente vonstatten geht.

Da viele Komponenten des Komplexes, der möglicherweise an der Nukleation neuer Aktinfilamente in T-Zellen beteiligt ist, auch in Thrombozyten vorkommen und da ein wichtiger Bestandteil dieses Komplexes, Fyb/SLAP, nur in den Lamellipodien aktivierter Thrombozyten zu finden ist, ist es möglich, daß sich dieser Komplex auch in Thrombozyten an der Spitze der Lamellipodien befindet und dort die Nukleation neuer Aktinfilamente bewirkt.

Es ist aber wahrscheinlich, daß alle drei möglichen Mechanismen, "Uncapping", "Severing" und Nukleation von Zellen genutzt werden ihr Aktinzytosklett zu reorganisieren.

5.13 Es gibt Hinweise auf analoge Aktinnukleations-Komplexe in nicht-hämatopoietischen Zellen

In Extrakten von *Xenopus* Oozyten wird die Aktinnukleation und -polymerisation an Latex-Beads induziert, die mit aktiviertem CDC42 beschichtet wurden. Durch biochemische Auftrennung des Extraktes wurde festgestellt, daß hierfür zwei Proteinkomplexe nötig sind: Der Arp2/3-Komplex und ein weiterer Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 400-500 kDa (Ma et al., 1998).

Dies läßt erwarten, daß für verschiedene Zellarten und verschiedene Aktin-Polymerisationsprozesse, wie Filopodien-, Lamellipodien- und Stressfaserbildung, jeweils spezifische Komplexe existieren, wodurch sich diese Prozesse räumlich wie zeitlich getrennt regulieren lassen.

5.14 Ausblick

Die Isolierung und Charakterisierung dieser Komplexe, die in nicht-hämatopoietischen Zellen für die Aktinnukleation und -polymerisation verantwortlich sein könnten, stellt daher eine wichtige Herausforderung für zukünftige Arbeiten dar.

Um dieses Ziel zu erreichen sind mehrere Ansätze möglich: Eine Möglichkeit besteht darin, die Komplexe durch Immunpräzipitation aus verschiedenen Zellextrakten von aktivierten, motilen Zellen zu isolieren. Mögliche ubiquitär vorkommende Bestandteile des Komplexes, wie N-WASP, Scar/WAVE, Grb2 und Nck sind gute Kandidaten um die ganzen Komplexe immunpräzipitieren zu können. Auf diese Weise könnten möglicherweise auch zu SLP-76 und Fyb/SLAP analoge Proteine in nicht-hämatopoietischen Zellen identifiziert werden.

Da N-WASP an der Ausbildung von Filopodien (Miki et al., 1998 a) und Scar/WAVE an der Bildung von Lamellipodien beteiligt ist (Miki et al., 1998 b), ist es wahrscheinlich, daß sich jeweils unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe immunpräzipitieren lassen, die für die Regulation dieser verschiedenen Prozesse verantwortlich gemacht werden können.

Ein weiterer Ansatz besteht darin, direkt nach SLP-76 bzw. Fyb/SLAP analogen Proteinen in nicht-hämatopoietischen Zellen zu suchen. Dazu könnte derselbe Versuchsansatz wie in dieser Arbeit verwendet werden: Mit den polyklonalen Antikörpern, die mit der Bindungsstelle der EVH1-Domäne interagieren, könnten Genexpressionbibliotheken sehr motiler Zellen durchsucht werden. Da in hämatopoietischen Zellen Nck der Mittler zwischen WASP und SLP-76 ist, könnten funktionale SLP-76 analoge Proteine als Bindungspartner von Nck isoliert werden. Diese könnten sowohl biochemisch an Nck-Affinitätssäulen, als auch molekularbiologisch aus Genexpressionsbibliotheken isoliert werden.

Die Analyse dieser Komplexe wird dazu beitragen, die Mechanismen aufzuklären, durch die die Aktin-vermittelte Zellbewegung kontrolliert wird.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bekannte und neue Bindungspartner der EVH1-Domäne der Ena/VASP Familie charakterisiert.

1. Gegen einen bekannten Bindungspartner der EVH1-Domäne, das humane Zyxin, wurden monoklonale Antikörper hergestellt. Zwei monoklonale Antikörper, 164D4 und 184A3, wurden eingehend charakterisiert und die von ihnen erkannten Epitope kartiert. Damit standen spezifische Nachweismethoden zur Verfügung, die für die Untersuchung der subzellulären Verteilung von Zyxin verwendet wurden. Zyxin findet sich in fokalen Kontaktpunkten und Stressfasern, in denen es in einer periodischen Anordnung mit α -Aktinin kolokalisiert. Weder im Zellkern, noch in Lamellipodien konnte Zyxin detektiert werden. Auf diese Weise wurden die von anderen Arbeitsgruppen mit Antiseren gegen Zyxin aus dem Huhn oder Schwein erarbeiteten Ergebnisse zum Teil bestätigt. Die Anordnung von Zyxin in einem periodischen Muster konnte präzisiert, die Lokalisation in Lamellipodien aber widerlegt werden.
2. Um die Dynamik von Zyxin *in vivo* untersuchen zu können wurde es als GFP-Fusionsprotein transient exprimiert und in Zusammenarbeit mit Klemens Rottner (Institut für Molekularbiologie, Akademie der Wissenschaften, Salzburg, Österreich) GFP-Zyxin stabil exprimierende Zelllinien etabliert. Hiermit wurde das dynamische Verhalten von Zyxin während des Ausbreitens von Zellen auf einem Substrat untersucht. Zyxin integriert sehr schnell in entstehende fokale Kontakte, ist aber nicht in Lamellipodien zu finden. Anschließend wurde die Dynamik von GFP-Zyxin mit der von Rhodamin-markiertem Vinculin verglichen. Zyxin und Vinculin werden zum gleichen Zeitpunkt während der Bildung fokaler Komplexe, der Vorläufer der fokalen Kontakte, eingebaut, verhalten sich aber bei deren Reifung unterschiedlich. Zyxin ist während des Abbaus und der Bewegung von fokalen Kontaktpunkten schnell nicht mehr zu detektieren während Vinculin länger verbleibt.
3. Mit polyklonalen Antikörpern, die gegen die Bindungsstelle der EVH1-Domäne im ActA Protein hergestellt wurden, konnte ein neuer Bindungspartner der EVH1-Domäne, Fyb/SLAP, kloniert werden. Es wurden verschiedene GST-Fusionsproteine hergestellt und aufgereinigt. In der Aminosäuresequenz von Fyb/SLAP wurde eine potentielle G-Aktinbindungsstelle mit hoher Homologie zur G-Aktinbindungsstelle im Thymosin- β 4 und eine Region identifiziert, die eine Ähnlichkeit mit einer Sequenz in ActA und iActA aufweist.

4. Zwei Isoformen, Fyb/SLAP1 und 2, wurden kloniert, wobei die Sequenz von Fyb/SLAP2 138bp bzw. 46 Aminosäuren länger ist. Es wurden polyklonale, affinitätsgereinigte Antikörper hergestellt, die spezifisch beide Isoformen (#51) oder nur Fyb/SLAP2 (#81) erkennen. Mit letzteren wurde gezeigt, daß die Isoform Fyb/SLAP2 für das Auftreten der Bande mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 130 kDa im Western Blot verantwortlich ist, während die Antikörper #51 eine Doppelbande von 120 und 130 kDa erkennen.
5. Diese polyklonalen Antikörper (#51) wurden auch zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Fyb/SLAP verwendet. Fyb/SLAP kolokalisiert in Lamellipodien sich ausbreitender, aktivierter Thrombozyten mit F-Aktin und VASP und hat eine deutlich andere Verteilung als Zyxin und Vinculin. In aktivierten Jurkat T-Zellen kolokalisiert Fyb/SLAP in Lamellipodien und an der Kontaktstelle mit anti-CD3 beschichteten Beads mit F-Aktin, WASP, Vav und Evl.
6. Fyb/SLAP bindet *in vitro* und *in vivo* an die EVH1-Domäne der Proteine der Ena/VASP Familie. *In vitro* wurde diese Bindung mit Overlays von radioaktiv-markierten Mena und VASP Konstrukten auf einem Western Blot verschiedener Fyb/SLAP GST-Fusionsproteine und *in vivo* durch Koimmunpräzipitation mit VASP gezeigt. Die Bindungsstelle von VASP und Mena in Fyb/SLAP konnte genau kartiert werden und entspricht dem Konsensus der Bindungsstelle der EVH1-Domäne.
7. Durch Sequenzanalyse wurde im Carboxyterminus von Fyb/SLAP eine SH3-Domäne postuliert (Da Silva et al., 1997 b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es sich um eine funktionale SH3-Domäne handelt, die spezifisch prolinreiche Bindungsstellen der Klasse II und die Tyrosinkinase c-Abl *in vivo* bindet.
8. In einem funktionalen Assay konnte gezeigt werden, daß die Proteine der Ena/VASP-Familie für die Aktinreorganisation, die während der T-Zell Aktivierung stattfindet, essentiell sind.
9. WASP und Fyb/SLAP lassen sich *in vivo* als Komplex koimmunpräzipitieren. Dieser Komplex könnte die ActA analoge Funktion haben, die Aktinnukleation und -polymerisation zu induzieren und wäre damit das erste zelluläre Äquivalent zu ActA. Weiterführende Experimente werden zeigen, ob WASP durch die Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes wirklich ähnlich dem Aminoterminal von ActA die Nukleation von neuen Aktinfilamenten

bewirken und ob die Inhibierung dieser Bindung die Aktinreorganisation in T-Zellen und damit auch ihre Aktivierung verhindern kann.

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen konnten wichtige Einblicke in die Funktion der zellulären Bindungspartner der EVH1-Domäne der Proteine der Ena/VASP-Familie gewonnen werden. So wurde nicht nur eine Verbindung zwischen der Signalkaskade der Aktivierung von T-Zellen mit der Regulation der Aktinreorganisation aufgedeckt, sondern auch ein Komplex identifiziert, der die ActA analoge Funktion haben könnte, die Aktinnukleation und -polymerisation zu induzieren.

Weiterführende Experimente werden zeigen, ob ähnlich zusammengesetzte Komplexe in allen Zellen für die räumliche und zeitlich regulierte Aktinpolymerisation verantwortlich sind.

7 Literaturverzeichnis

- Abel, K., Lingnau, A., Niebuhr, K., Wehland, J. and Walter, U. (1996) Monoclonal antibodies against the focal adhesion protein VASP revealing epitopes involved in the interaction with two VASP binding proteins and VASP phosphorylation. *Eur. J. Cell Biol.*, **69**, (Suppl. 42): 39a.
- Aber, S., Halder, G. and Caroni, P. (1994) Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*, **79**, 221-231.
- Aber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Berand, O. and Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, **393**, 805-809.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1990) Molekularbiologie der Zelle. 2.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Bundesrepublik Deutschland.
- Alexandrova, A.Y. and Vasiliev, J.M. (1984) Focal contacts of spreading platelets with the substratum. *Exp. Cell Res.*, **153**, 254-258.
- Arpin, M., Pringault, E., Finidori, J., Garcia, A., Jeltsch, J.-M., Vandekerckhove, J. and Louvard, D. (1988) Sequence of human villin: A large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to villin specificity. *J. Cell Biol.*, **107**, 1759-1766.
- Aspenström, P., Lindberg, U. and Hall, A. (1996) Two GTPases, CDC42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.*, **6**(1), 70-75.
- Aspenström, P. (1999) Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 95-102.
- Aszódi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X.-H., Ny, L., Andersson, K.-E., Kehrel, B., Offermanns, S. and Fässler, R. (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist induced platelet aggregation but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.*, **18** (1), 37-48.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B. and Imhof, B.A. (1998) Actin dynamics in living mammalian cells. *J. Cell Sci.*, **111**, 1649-1658.
- Bear, J.E., Rawls, J.F. and Saxe III, C.L. (1998) SCAR, a WASP-related Protein, Isolated as a Suppressor of Receptor Defects in Late Dictyostelium Development. *J. Cell Biol.*, **142**(5), 1325-1335.
- Beckerle, M.C. (1986) Identification of a new protein localized at sites of cell-substrate adhesion. *J. Cell Biol.*, **103**, 1679-1687.
- Beckerle, M.C. (1997) Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *BioEssays*, **19**(11), 949-957.
- Beckerle, M.C. (1998) Spatial control of actin filament assembly: Lessons from *Listeria*. *Cell*, **95**, 741-748.

- Behnke, O. and Bray, D. (1988) Surface movements during the spreading of blood platelets. *Eur. J. Cell Biol.*, **46**, 207-216.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-642.
- Ben-Ze'ev, A. (1997) Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 99-108.
- Bershadsky, A.D. and Vasiliev, J.M. (1988) Cytoskeleton. Plenum Press, New York.
- Bi, E. and Zigmond, S.H. (1999) Actin polymerization: Where the WASP stings. *Curr Biol.*, **9**, R160-R163.
- Brenner, S.L. and Korn, E.D. (1980) The effects of Cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J. Biol. Chem.*, **255**, 841-844.
- Bretscher, A. (1991) Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **7**, 337-374.
- Brindle, N.P.J., Holt, M.R., Davies, J.E., Price, C.J. and Critchley, D.R. (1996) The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem. J.*, **318**, 753-757.
- Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J.-Y., Mayer, B., Chernoff, J., Strauss, D. and Chan, A.C. (1998) Regulation of PAK activation and the T-cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity*, **9**, 607-616.
- Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S. and Jockusch, B.M. (1992) Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **22**, 51-61.
- Cantrell, D. (1998) The real LAT steps forward. *Trends Cell Biol.*, **8**, 180-182.
- Carlier, M.-F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.-X., Hong, Y., Chua, N.-H., & Pantaloni, D. (1997) Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1307-1322.
- Carlier, M.-F. (1998) Control of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 45-51.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Reinhard, M., Walter, U. and Wehland, J. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.*, **14**, 1314-1321.
- Chakraborty, T. & Wehland, J. (1997). The host cell infected with *L.monocytogenes*. In: S.H.E.Kaufmann (Ed). Host Response to Intracellular Pathogens, R.G. Landes Co., Austin, Texas, USA:271-290.
- Chan, D.C., Bedford, M.T. and Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J.*, **15**, 1045-1054.

- Chen, H.I. and Sudol, M. (1995) The WW domain of yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3 binding modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7819-7823.
- Crawford, A.W. and Beckerle, M.C. (1991) Purification and characterization of Zyxin, an 82,000-Dalton component of adherens junctions. *J. Biol. Chem.*, **266**(9), 5847-5853.
- Crawford, A.W., Michelsen, J.W. and Beckerle, M.C. (1992) An Interaction between Zyxin and α -Actinin. *J. Cell Biol.*, **116**(6), 1381-1393.
- Crawford, A.W., Pino, J. and Beckerle, M.C. (1994) Biochemical and molecular characterization of cCRP, a LIM domain protein that is developmentally regulated and associated with the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **124**, 117-128.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S. and Bustelo, X.R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the *vav* proto-oncogene product. *Nature*, **385**, 169-172.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biol. Sci.*, **20**, 448-455.
- Da Silva, A.J., Rosenfield, J.M., Mueller, I., Bouton, A., Hirai, H. and Rudd, C.E. (1997) Biochemical analysis of p120/130. A protein-tyrosine kinase substrate restricted to T and myeloid cells. *J. Immun.*, **158**, 2007-2016.
- Da Silva, A.J., Li, Z., De Vera, C., Canto, E., Findell, P. and Rudd, Ch.E. (1997) Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7493-7498.
- Dirks, W., Schaper, F. and Hauser, H. (1994) A new hybrid promoter directs transcription at identical start points in mammalian cells and in vitro. *Gene*, **149**(2), 389-390.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. & Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.*, **11**, 1981-1990.
- Dyche Mullins, R., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 6181-6186.
- Fischer, K.-D., Kong, Y.-Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E.M., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M.P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A. and Penninger, J.M. (1998) Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.*, **8**, 554-562.
- Franck, R. (1992) Spot synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, **48**, 9217-9232
- Freyd, G., Kim, S.K. and Horvitz, H.R. (1990) Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*, **344**, 876-879.

- Friederich, E., Vancompernelle, K., Huet, C., Goethals, M., Finidori, J., Vandekerckhove, J. and Louvard, D. (1992) An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell*, **70**, 81-92.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, **65**, 1127-1141
- Geiger, B., Rosen, D. and Berke, G. (1982) Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J. Cell Biol.*, **95**, 137-143.
- Geppert, T.D. and Lipsky, P.E. (1990) Regulatory role of microfilaments in the induction of T4 cell proliferation and interleukin 2 production. *Cell. Immunol.*, **131**, 205-218.
- Gerstel, B., Gröbe, L., Pistor, S., Chakraborty, T. and Wehland, J. (1996) The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins. *Infect. Immun.*, **64**, 1929-1936.
- Gertler, F.B., Doctor, J.S. and Hoffmann, F.M. (1990) Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* abl proto-oncogene homolog. *Science*, **248**, 857-860.
- Gertler, F.B., Comer, A.R., Juang, J.-L., Ahern, S.M., Clark, M.J., Liebl, E.C. and Hoffmann, F.M. (1995) *enabled*, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes & Dev.*, **9**, 521-533.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. and Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-239.
- Goldberg, M.B. and Theriot, J.A. (1995) *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6572-6576.
- Golsteyn, R.M., Beckerle, M.C. Koay, T. and Friedrich, E. (1997) Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Sci.*, **110**, 1893-1906.
- Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**, 345-357.
- Halbrügge, M. and Walter, U. (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 41-50.
- Halbrügge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbächer, P. and Walter, U. (1990) Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46 kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.* **265**, 3088- 3093
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Han, J., Das, B., Wie, W., Van Aelst, L., Mosteller, R.D., Khosravi-Far, R., Westwick, J.K., Der, C.J. and Broek, D. (1997) Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell Biol.*, **17** (3), 1346-1353.

- Hartwig, J.H. (1992) Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J. Cell Biol.*, **118**(6), 1421-1442.
- Hartwig, J.H., Bokoch, G.M., Carpenter, C.L., Janmey, P.A., Taylor, L.A., Toker, A., and Stossel, T.P. (1995) Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap Actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*, **82**, 643-653.
- Hobert, O., Schilling, J.W., Beckerle, M.C., Ullrich, A. and Jallal, B. (1996) SH3 domain-dependent interaction of the proto-oncogene product Vav with the focal contact protein zyxin. *Oncogene*, **12**, 1577-1581.
- Holsinger, L.J., Graef, I.A., Swat, W., Chi, T., Bautista, D.M., Davidson, L., Lewis, R.S., Alt, F.W. and Crabtree, G.R. (1998) Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr. Biol.*, **8**, 563-572.
- Honoré, B., Madsen, P., Andersen, A.H. and Leffers, H. (1993) Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett.*, **330**, 151-155.
- Hüttelmayer, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M. and Rüdiger, M. (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and Vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr. Biol.*, **8**, 479-488.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: Versality, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.
- Jackman, J.K., Motto, D.G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C.W., Peltz, G.A., Koretzky, G.A. and Findell, P.R. (1995) Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T-cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7029-7032.
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rüdiger, M., Schlüter, K., Stanke, G. and Winkler, J. (1995) The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 379-416.
- Jockusch, B.M. and Rüdiger, M. (1996) Crosstalk between cell adhesion molecules: vinculin as a paradigm for regulation by conformation. *Trends Cell Biol.*, **6**, 311-315.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, **68**, 521-531
- Kocks, C., Marchand, J.B., Gouin, E., d'Hauteville, H., Sansonetti, P.J., Carlier, M.F. and Cossart, P. (1995) The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol. Microbiol.* **18**, 413-423.
- Kolluri, R., Talias, K.F., Carpenter, C.L., Rosen, F.R. and Kirchhausen, T. (1996) Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5615-5618.
- Koretzky, G.A. (1997) The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation. *Immun. Today*, **18**, 401-406.
- Kreft, J., Dumbsky, M. and Theiss, S. (1995) The actin-polymerization protein from *Listeria ivanovii* is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence homology to ActA from *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **126**, 113-122.

- Kupfer, A., Swain, S.L. and Singer, S.J. (1987) The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *J. Exp. Med.*, **165**, 1565-1580.
- Laine, R.O., Zeile, W., Kang, F., Purich, D.L. and Southwick, F.S. (1997) Vinculin proteolysis unmasks an ActA homolog for actin-based *Shigella* motility. *J. Cell Biol.*, **138**(6), 1255-1264.
- Lambrechts, A., Verschelde, J.-L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1997) The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP₂ and proline-rich sequences. *EMBO J.*, **16**(3), 484-494.
- Lasa, I., David, V., Gouin, E., Marchand, J.-B. and Cossart, P. (1995) The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.*, **18**(3), 425-436.
- Lasa, I., Gouin, E., Goethals, M., Vancompernelle, K., David, V., Vandekerckhove, J. & Cossart, P. (1997) Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.*, **16**, 1531-1540.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. and Chakraborty, T. (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun.*, **63**, 3896-3903
- Lowin-Kropf, B., Smith Shapiro, V. and Weiss, A. (1998) Cytoskeletal polarization of T-cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell Biol.*, **140**, 861-871.
- Ludin, B. and Matus, A. (1998) GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.*, **8**, 72-77.
- Ma, L., Rohatgi, R. and Kirschner, M.W. (1998) The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (26), 15362-15367.
- Macalma, T., Otte, J., Hensler, M.E., Bockholt, S.M., Louis, H.A., Kalff-Suske, M., Grzeschik, K.-H., von der Ahe, D. and Beckerle, M.C. (1996) Molecular characterization of human Zyxin. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31470-31478.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.M., Ampe, Ch., Vandekerckhove, J. and Pollard, T.D. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.*, **127**, 107-115.
- Machesky, L.M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F.J., Grogan, A., Totty, N.F., Burlingame, A.L., Hsuan, J.J. and Segal, A.W. (1997) Mammalian actin related 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem. J.*, **328**, 105-112.
- Machesky, L. and Insall R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.*, **8**, 1347-1356.
- Maher, P.A., Pasquale, E.B., Wang, J.Y.J. and Singer, S.J. (1985) Phosphotyrosine-containing proteins are concentrated in focal adhesions and intercellular junctions in normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6576-6580.

- Marie-Cardine, A., Kirchgesser, H., Eckerskorn, C., Meuer, S.C. and Schraven, B. (1995) Human T lymphocyte activation induces tyrosine phosphorylation of α -tubulin and its association with the Sh2 domain of the p59^{fyn} protein tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 3290-3297.
- Matsuyama, T., Yamada, A., Deusch, K., Sleasman, J., Daley, J.F., Torimoto, Y. and Abe, T. (1991) Cytochalasins enhance the proliferation of CD4 cells through the CD3-Ti antigen receptor complex or the CD2 molecule through an effect on early events of activation. *J. Immunol.*, **146**, 3736-3741.
- McPherson, M.J., Quirke, P. and Tayler, G.R. (Ed.) (1991) PCR: A practical approach. IRL Press Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- McPherson, M.J., Hames, B.D. and Tayler, G.R. (Ed.) (1995) PCR 2: A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Mengoud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M. & Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, **84**, 923-932.
- Miki, H., Miura, K. and Takenawa, T. (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.*, **15**(19), 5326-5335.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. and Takenawa, T. (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, **391**, 93-96.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.*, **17** (23), 6932-6941.
- Miki, H. and Takenawa, T. (1998) Direct binding of the Verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **243**, 73-78.
- Mitchison, T.J. and Cramer, L.P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **84**, 371-379.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. and Yamada, K.M. (1995) Integrin function: Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol.*, **131**(3), 791-805.
- Motto, D.G., Ross, S.E., Wu, J., Hendricks-Taylor, L.R. and Koretzky, G.A. (1996) Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated Interleukin 2 production. *J. Exp. Med.*, **183**, 1937-1943.
- Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M. and Sansonetti, P.J. (1990) Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.*, **58**, 1048-1058.
- Musci, M.A., Hendricks-Taylor, L.R., Motto, D.G., Paskind, M., Kamens, J., Turck, Ch.W. and Koretzky, G.A. (1997) Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11674-11677.

- Musci, M.A., Motto, D.G., Ross, S.E., Fang, N. and Koretzky, G.A. (1997) Three domains of SLP-76 are required for its optimal function in a T-cell line. *J. Immunol.*, **159**, 1639-1647.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J. and Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.*, **16**, 5433-5444.
- Niebuhr, K. and Wehland, J. (1997) Screening of antibody epitopes and regions of protein-protein interaction sites using SPOT peptides. In: Immunology Methods Manual, Academic Press, 797-800.
- Niebuhr, K., Lingnau, A., Frank, R. and Wehland, J. (1998) Rapid procedures for preparing monoclonal antibodies and identifying their epitopes. In: Cell Biology: A laboratory handbook. Second Edition. Vol.2, Academic Press, 398-403.
- Nix, D.A. and Beckerle, M.C. (1997) Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: A potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J. Cell Biol.*, **138**(5), 1139-1147.
- Nolte, C., Eigenthaler, Schanzenbächer, P. & Walter, U. (1991) Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors. *J. Biol. Chem.* **266**, 14808-14812.
- Nonoyama, S. and Ochs, H.D. (1998) Characterization of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and its role in the disease. *Curr. Opin. Immun.*, **10**, 407-412.
- Olson, M.F., Pasteris, N.G., Gorski, J.L. and Hall, A. (1996) Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr. Biol.*, **6** (12), 1628-1633.
- Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell*, **75**, 1007-1014.
- Parsey, M.V. and Lewis G.K. (1993) Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells. *J. Immunol.*, **151** (4), 1881-1893.
- Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. & Wehland, J. (1994) The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J.*, **13**, 758-763.
- Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U. & Wehland, J. (1995) The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr. Biol.*, **5**, 517-525.
- Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F.W. and Geha, R.S. (1998) Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell*, **94**, 229-238.
- Prasad, K.V.S., Janssen, O., Kapeller, R., Raab, M., Cantley, L.C. and Rudd, C.E. (1993) Src-homology 3 domain of protein kinase p59^{lyn} mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7366-7370.

- Raab, M., da Silva, A.J., Findell, P.R. and Rudd, C.E. (1997) Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR ζ /CD3 induction of Interleukin-2. *Immunity*, **6**, 155-164.
- Rana, A.P., Ruff, P., Maalouf, G.J., Speicher, D.W. and Chishti, A.H. (1993) Cloning of human erythroid dematin reveals another member of the villin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6651-6655.
- Reinhard, M., Halbrügge, M., Scheer, U., Wiegand, Ch., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1992) The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.*, **11**, 2063-2070.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.*, **14**, 1583-1589.
- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripier, D. and Walter, U. (1995) Identification, purification and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7956-7960.
- Reinhard, M., Rüdiger, M., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.*, **399**, 103-107.
- Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H. and Robbins, K.C. (1995) Wiskott-Aldrich Syndrome Protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol. Cell. Biol.*, **15**(10), 5725-5731.
- Robinson, A., Gibbins, J., Rodriguez-Linares, B., Finan, P.M. Wilson, L., Kellie, S., Findell, P. and Watson, S.P. (1996) Characterization of Grb2-binding proteins in human platelets activated by Fc γ RIIA cross-linking. *Blood*, **88**, 522-530.
- Rowley, J.D. (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, **243**, 290-293.
- Rudd, C.E., Janssen, O., Prasad, K.V.S., Raab, M., da Silva, A., Telfer, J.C. and Yamamoto, M. (1993) src-related protein tyrosine kinases and their surface receptors. *Biochem. Biophys. Acta*, **1155**, 239-266.
- Rudd, C.E. (1999) Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell*, **96**, 5-8.
- Rüdiger, M. (1998) Vinculin and α -catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *BioEssays*, **20**, 733-740.
- Ryser, J.-E., Rungger-Brändle, E., Chaponnier, C., Gabbani, G. and Vassali, P. (1982) The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells show high motility and polarization of actin, but not myosin. *J. Immunol.*, **128** (3), 1159-1162.
- Sadler, I., Crawford, A.W., Michelsen, J.W. and Beckerle, M.C. (1992) Zyxin and cCRP: Two Interactive LIM Domain Proteins Associated with the Cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **119**(6), 1573-1587.

- Salgia, R., Li, J.-L., Ewaniuk, D.S., Pear, W., Pisick, E., Burky, S.A., Ernst, T., Sattler, M., Chen, L.B. and Griffin, J.D. (1997) BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. *J. Clin. Invest.*, **100** (1), 46-57.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Press
- Samelson, L.E., Phillips, A.F., Luong, E.T. and Klausner, R.D. (1990) Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4358-4362.
- Schafer, D.A. and Cooper, J.A. (1995) Control of actin assembly at filament ends. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 497-518.
- Schlüter K., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (1997) Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys. Acta*, **1359**, 97-109.
- Schmeichel, K.L. and Beckerle, M.C. (1994) The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, **79**, 211-219.
- Sechi, A., Wehland, J. and Small, J.W. (1997) The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: A tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J. Cell Biol.*, **137**(1), 155-167.
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M. and Chernoff, J. (1996) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr. Biol.*, **7**, 202-210.
- Sheehan, B., Kocks, C. Dramsi, S., Gouin, E., Klarsfeld, A., Mengoud, J. and Cossart, P. (1994). Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Topic. Microbiol. Immunol.*, **192**, 187-216
- Small, J.V., Isenberg, G. and Celis, J.E. (1978) Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*, **271**, 638-639.
- Small, J.V., Herzog, M. and Anderson, K. (1995) Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J. Cell Biol.*, **129**, 1275-1286.
- Small, J.V., Anderson, K. and Rottner, K. (1996) Actin and the Coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci. Reports*, **16**(5), 351-368.
- Smith, G.A., Theriot, J.A. and Portnoy, D.A. (1996) The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the Rate of Actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein and Profilin. *J. Cell Biol.*, **135** (3), 647-660.
- Songyang, Z. and Cantley, L.C. (1995) Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 470-475.
- Sparks, A.B., Rider, J.E., Hoffman, N.G., Fowlkes D.M., Quilliam, L.A. and Kay B.K. (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLC γ , Crk and Grb2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1540-1544.

- Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J. and Chant, J. (1995) Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5027-5031.
- Suetsugo, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.*, **17**, 6516-6526.
- Sun, H.-Q., Kwiatkowska, K. and Yin, H.L. (1995) Actin monomer binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 102-110.
- Suzuki, T., Saga, S. and Sasakawa, C. (1996) Functional analysis of *Shigella* VirG domains essential for interaction with vinculin and actin-based motility. *J. Biol. Chem.*, **271** (36), 21878-21885.
- Suzuki, T., Miki, H., Takenawa, T. and Sasakawa, C. (1998) Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*. *EMBO J.*, **17**(10), 2767-2776.
- Symons, M., Derry, J.M.J., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo, A. (1996) Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in Actin polymerization. *Cell*, **84**, 723-734.
- Tapon, N. and Hall, A. (1997) Rho, Rac and CDC42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 86-92.
- Theriot, J.A. and Mitchison, T.J. (1991) Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*, **352**, 126-131.
- Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J. and Mitchison T.M. (1994) Involvement of Profilin in the Actin-based motility of *L. monocytogenes* in Cells and in Cell-free extracts. *Cell*, **76**, 505-517.
- Theriot, J.A. (1997) Accelerating on a treadmill: ADF/Cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **136**(6), 1165-1168.
- Tilney, L.G. and Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.*, **109**, 1597-1608.
- Toker, A. and Cantley, L.C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, **387**, 673-676.
- Tuosto, L., Michel, F. and Acuto, O. (1996) p95^{vav} associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen stimulated T cells. *J. Exp. Med.*, **184**, 1161-1166.
- Vaduva, G., Martin N.C. and Hopper A.K. (1997) Actin-binding Verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **7**, 1821-1833.
- Van Etten, R.A., Jackson, P.K., Baltimore, D., Sanders, M.C., Matsudaira, P.T. and Janmey, P.A. (1994) The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J. Cell Biol.*, **124** (3), 325-340.
- Van Troys, M., Dewitte, D., Goethals, M., Carlier, M.-F., Vanderkerckhove, J. and Ampe, C. (1996) The actin binding site of thymosin β 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.*, **15**, 201-210.

- Wang Y.L. (1985) Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.*, **101**, 597-602.
- Wang L.F., Miao, S.Y., Zong, S.D., Bai, Y. and Koide, S.S. (1994) Gene encoding a mammalian epididymal protein. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**(6), 1131-1136.
- Wasserman, S. (1998) FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.*, **8**, 111-115.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.*, **16**(11), 3044-3056.
- Watson S.P. and Gibbins, J. (1998) Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immun. Today*, **19**(6), 260-264.
- Weiss, A. and Littman, D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, **76**, 263-274.
- Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. & Mitchison, T.J. (1997) Actin dynamics *in vivo*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 54-61
- Welch, M.D., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**, 265-269.
- Welch, M.D., DePace, A.H., Verma, S., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionally conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J. Cell Biol.*, **138**, 375-384.
- Welch M.D., Rosenblatt, J., Skoble J., Portnoy, D.A. and Mitchison, T.J. (1998) Interaction between the human Arp2/3 complex and *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, **281**, 105-108.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A.; Kangawa, K., Nishida, E. and Mizuno, K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, **393**, 809-812.
- Yamada, K.M. and Geiger, B. (1997) Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 76-85.
- Zeile, W.L., Purich, D.L. and Southwick, F.S. (1996) Recognition of two classes of oligoproline sequences in profilin-mediated acceleration of actin-based *Shigella* motility. *J. Cell Biol.*, **133**(1), 49-59.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T-cell receptor to cellular activation. *Cell*, **92**(1), 83-92.
- Zigmond, S.H. (1996) Signal transduction and actin filament organization. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 66-73.
- Zobel, C.R. and Woods, A. (1983) Effect of calcium on the morphology of human platelets spread on glass substrates. *Eur. J. Cell Biol.*, **30**, 83-92.

Zumbrunn, J. and Trueb, B. (1996) A zyxin-related protein whose synthesis is reduced in virally transformed fibroblasts. *Eur.J.Biochem.*, **241**, 657-663.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ActA	Aktin-Nukleationsfaktor
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]oktan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dimethylpimelimidat-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreseineisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	Konzentriert
l	Liter
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal Essential Medium
Mena	mammalian Enabled
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
o/n	über Nacht
p.a.	pro analysi
pAk	polyklonale Antikörper
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleid acid

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline + Tween 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Upm	Umdrehungen pro Minute
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

9 Danksagungen

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie und Immunologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) durchgeführt.

Mein größter Dank gilt Prof. Jürgen Wehland für die engagierte Betreuung meiner Arbeit und für die weit über das übliche Maß hinausgehende Unterstützung, die er mir gewährt hat. Durch ihn habe ich einen guten Einblick in die "große Wissenschafts-Welt" erhalten und sehr viel gelernt. Danke!

Für die Betreuung in der Anfangsphase danke ich besonders Dr. Kirsten Niebuhr-Ebel (Kiste!) und Dr. Bernd Haase. Bianka Jansen danke ich für die Tips im "molekularbiologischen Alltag" und Marlies Konradt für die außerordentliche Hilfe bei Subklonierungen und Fusionen.

Mein besonder Dank geht an die Laborbesatzung von "D0.37" und "A 2.43" (Barbara Behrendt, Dr. Uwe Carl, Petra Hagendorf, Bianka Jansen, Simone Müller, Dr. Kirsten Niebuhr-Ebel und Marc Pollmann) für unsere enge Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima, Diskussionen, Rat, Tat und Spaß!!! ;-)

Simone Müller danke ich besonders für ausgiebige wissenschaftliche Diskussionen, die mir nicht nur sehr geholfen, sondern auch viel Spaß gemacht haben und natürlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Natürlich ein ganz großes Dankeschön für das nette Arbeitsklima an alle weiteren Mitarbeiter/innen unserer Arbeitsgruppe: Dr. Judith Dädelow, Dr. Uwe Dehmel, Brigitte Denker, Dr. Christian Erck, Marcus Geese, Lothar Gröbe, Dr. Uwe Kärst, Dr. Henryk Kalisz, Marlies Konradt, Dr. Dave Monner, Reiner Munder, Dr. Susanne Pistor, Nicole Rürup, Dr. Antonio Secci und natürlich der "Seele der Abteilung" Amanda Mühlmann.

Ein weiterer Dank geht an Klemens Rottner, Mario Gimona und die ganze Salzburger Arbeitsgruppe für eine hervorragende Zusammenarbeit und gute Diskussionen.

Meinen Eltern danke ich für die große Unterstützung nicht nur finanzieller Art, sondern auch, daß sie mich immer frei entscheiden lassen und mich menschlich unterstützen.

Ute Kohstall danke ich für die private Ausgeglichenheit und Freude, die ich durch sie habe, ihre Geduld und Toleranz gegenüber meiner "Arbeitswut" und natürlich für das aufopferungsvolle Korrekturlesen dieser Arbeit.